

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Söötmekomponentide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile

Bakalaureusetöö

12 EAP

Marge Puhm

Juhendajad PhD Riho Teras

MSc Hanna Ainelu

TARTU 2018

Söötmelementide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile

Pseudomonas putida on levinud mullabakter, mis risosfääris elades soodustab taime kasvu, vähendades taimepatogeenide nakatamise efektiivsust. Selleks, et *P. putida* püsiks juurtel ning konkureeriks patogeenidega, moodustab ta biofilmi. Globaalne regulaator Fis soodustab *P. putida* biofilmi teket täissöötmes LB, kuid defineeritud söötmes M9 glc CAA ei soodusta biofilmi. Selles töös püstitati hüpotees, et Fis-i biofilmi soodustav toime sõltub söötmelementidest, milles bakterit kasvatatakse. Teisisõnu, keskkonnast kättesaadavad toitained mõjutavad *P. putida* biofilmi moodustumist. Katsetest selgus, et Fis-i soodustav efekt *P. putida* biofilmi moodustumisele sõltub söötimest, milles baktereid kasvatati ning varem kirjeldatud *fis*-i üleekspressiooni biofilmi suurendav toime LB täissöötmes ei ole tingitud toitainete hulgast, vaid võib olla seotud valgulise komponendi sisaldusega söötmes.

Märksõnad: biofilm, *Pseudomonas putida*, Fis

CERCS kood ja nimetus: B220 – geneetika, tsütogeneetika

B230 – mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Effect of media components on *P. putida* biofilm

Pseudomonas putida is an ubiquitous soil bacterium that, while residing in the rhizosphere promotes plant growth by eliminating plant pathogens. In order to remain on the roots of the plant, it forms a biofilm. The global regulator Fis promotes the production of *P. putida* biofilm. The goal of this study is to investigate whether the positive effect of Fis on biofilm depends on the media components.

Keywords: Biofilm, *Pseudomonas putida*, Fis,

CERCS code and designation: B220 – genetics, cytogenetics

B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1. Risosfäär	5
1.2. <i>Pseudomonas</i> 'te risosfääri-kompetentsus	6
1.3. Biofilm ja selle olulisus	8
1.4. <i>Pseudomonas putida</i> biofilm	10
1.5. Globaalne regulaator Fis	11
2. Ekspermentaaloosa	13
2.1. Töö eesmärk	13
2.2. Materjal ja meetodika	13
2.2.1. Bakteritüved, söötmed ja plasmiid.	13
2.2.2. Kompetentide valmistamine ja elektroporatsioon.	14
2.2.3. B-galaktosidaasi eriaktiivsuse määramine	15
2.2.4. Biofilmi moodustumise mõõtmine	15
2.2.5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	16
2.2.6. Geelelektroforees	17
2.2.7. Statistiline analüüs	17
2.3. Tulemused	18
2.3.1. <i>P. putida</i> biofilm LB-täissöötmes ja M9 glc CAA söötmes	18
2.3.2. M9 glc CAA söötme komponentide mõju <i>P. putida</i> biofilmile	19
2.3.3. LB söötme komponentide mõju <i>P. putida</i> biofilmile	21
2.3.4. Trüptooni ja peptoonide mõju <i>P. putida</i> biofilmi moodustumisele	22
2.3.5. Toitainete mõju <i>P. putida</i> biofilmi moodustumisele	24
2.3.6. Geeni <i>lapA</i> mõju <i>P. putida</i> biofilmi moodustumisele	25
2.3.7. <i>P. putida</i> biofilmi seos <i>lapA</i> transkriptsiooniga	26
2.4. Arutelu	27
Kokkuvõte	30
Summary	31
Kasutatud kirjandus	32

Sissejuhatus

Perekonna *Pseudomonas* liigid on olulised bakterid nii patogeenidena kui ka patogeenide antagonistidena. Siia perekonda kuuluvad patogeensed liigid tekitavad haigusi taimel (*P. syringae*, *P. aeruginosa*), putukal (*P. entomophila*) ja inimesel (*P. aeruginosa*), samas leidub selles grupis ka taime kasvu soodustavaid liike, nagu *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* ja *P. putida*. Viimastel on hea taimejuurte koloniseerimise ning antimikroobsete ühendite tootmise võimekus. Sellest tulenevalt on nad olulise tähtsusega taimepatogeenide vastases kaitses. Samas, taimejuurtel püsimiseks moodustavad bakterid biofilmi, mille kujunemist mõjutavad ümbruskonnast pärit erinevad signaalid.

Meie laboris on eelnevalt kindlaks tehtud, et *P. putida* biofilmi tekkes on tähtis osa globaalsel regulaatoril Fis (ingl *factor for inversion stimulation*). Fis mõjutab *P. putida* biofilmi maatriksi olulise komponendi, kleepvalgu LapA geeni ekspressiooni ning seeläbi bakteri kinnitumist pinnale. Fis-i biofilmi soodustavat efekti on näidatud LB täissöötmes, kuid see puudub defineeritud M9 glc CAA söötmes. Sellest johtuvalt on selles töös püstitatud hüpotees, et söötmekomponendid mõjutavad Fis-i biofilmi võimendava efekti tekkimist *P. putida*’l. Töö eesmärgiks on selgitada, millisest söötmekomponendist sõltub Fis-i biofilmi võimendav efekt.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Risosfäär

Risosfääriks nimetatakse juure pinda ja seda vahetult ümbritsevat õhukest (~2 mm) mullakihti, mida iseloomustab risodepositsioon ehk taime toodetud süsinikuühendite liikumine juurte kaudu mulda. Näiteks teraviljataimed (nisu ja oder) eritavad juurte kaudu mulda 20-30% kogu assimileeritud süsinikust, heintaimed viivad fotosünteesi käigus omastatud süsinikust 30-50% risosfääri (Kuzyakov ja Domanski, 2000; Morgan jt., 2005). Taim eritab assimileeritud süsinikku juurte kaudu kahesuguste faktorite kujul: juuretippudest väikese molekulmassiga kergesti omastatavaid ühendeid ning juurte vanematest osadest suure molekulmassiga taimerakkude laguprodukte. Bakteritele on olulised juuretippude eritised, nagu aminohapped, orgaanilised happed, süsivesikud, ensüümid, rakulüsaadid, kuna nad on mikroobidele kergesti omastatavaks süsinikuallikaks, ning samuti süsihappegaas ja etüleen kui võimalikud signaalmolekulid (Badri jt., 2009). Samas, taimejuurte kasvamisega kaasneb juurerakkude irdumine juurte vanadest osadest, mistõttu vabanevad mulda suure molekulmassiga ühendid (polüsahhariidid, peptiidid). Seetõttu moodustab kogu juure pind mikroobide jaoks atraktiivse, toitainerikka ökoloogiliselt olulise niši.

Risosfääris püsimiseks peab bakter olema võimeline konkureerima toitainete pärast ning asustama juurestikku (Lugtenberg ja Kamilova, 2009). Taime juure koloniseerimise võib jagada kolme etappi (Espinosa-Urgel jt., 2002):

- 1) atraktiivsuse faas – bakteri kemotaksis juure suunas ning esmane kinnitumine
- 2) asustamise faas – juure ümber hakkab moodustuma bakterikoloonia,
- 3) paiksuse faas – bakteripopulatsioon püsib juurel ning saavutab maksimaalse suuruse, mida iseloomustab sõltuvus taime juuremassist.

Seemnete inokuleerimise järel jääb taime kasvades enamik baktereid juurekaela lähedusse. Nii taimele kasulikud kui ka patogeensed mikroorganismid hõivavad eelistatult juure epidermirakkude liitekohti (Chin-A-Woeng jt., 1997; Bolwerk jt., 2003), moodustades pinnakonarustes biofilmi. Bakterid katavad kuni 40% taimejuurte üldpinnast (Danhorn ja Fuqua, 2007) ning bakterite tihedus väheneb järsult juure tipu suunas (Chin-A-Woeng jt., 1997). Kuigi juurte vahetus läheduses on bakterite tihedus 10-100 korda suurem kui juurevabas mullas (Molina jt., 2000), on see siiski 100 korda väiksem kui laboris kasutatavas keskmises söötmes (Lugtenberg

ja Kamilova, 2009). Lisaks sellele koloniseerivad taime kasvu soodustavad risosfääribakterid taime juuri kiiremini ning võivad haigustekitajad välja konkureerida, kuna jätavad patogeeneid toitainetest ja/või signaalmolekulidest ilma (Bolwerk jt., 2003). Seega on nälgimine osa bakterite elust risosfääris.

1.2. *Pseudomonas*'te risosfääri-kompetentsus

Baktereid, mis koloniseerivad taime juuri ning on võimelised pikemat aega püsima juurtel, nimetatakse risosfääri-kompetentseteks bakteriteks. Risosfääri-kompetentseid baktereid iseloomustab kohanemine konkurentidega, surudes maha konkurentide toitainete omastamist, kasvamist ja paljunemist. Lisaks sellele on risosfääri-kompetentsed bakterid võimelised ära tundma taime signaalmolekule ning kohanenud taime juurte eritistega, suutes neutraliseerida toksilisi ühendeid, mida taim eritab, näiteks reaktiivseid hapnikuradikaale.

Perekonna *Pseudomonas* liikmetel on üldiselt hea risosfääri-kompetentsus (Lugtenberg jt., 2001). Perekonna *Pseudomonas* osa liike koloniseerivad taime juuri hästi, toodavad antibakteriaalseid aineid ning kaitsevad taimi patogeene eest (Lugtenberg jt., 2001; Weller jt., 2002). Sellest johtuvalt on taimekasvu soodustavad ning inimesele ohtunud perekonna *Pseudomonas*'e liigid üheks võimalikuks bioloogiliseks vahendiks, mille abil vähendada pestitsiidide kasutust põllumajanduslikult oluliste kultuurtaimede kasvatamisel (Zhang jt., 2017).

Heaks patogeeneidega konkureerimise näiteks on *Pseudomonas spp* ja *Fusarium oxysporum*'i vaheline olelusvõitlus tomati risosfääris. Tomati juurte eritatavad tsitraat ja glükoos soodustavad patogeense *Fusarium oxysporum*'i spooride idanemist, samas kui tomati risosfääri asustav *Pseudomonas fluorescens* WCS365 pärssib haigustekitaja *Fusarium oxysporum*'i spooride idanemist ning ka uute spooride teket (Kamilova Faina jt., 2008). *P. fluorescens* WCS365 ja *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 koloniseerivad edukalt tomati juuri ja samas ka patogeeni *Fusarium oxysporum forma specialis radicle-lycopersici* hüüfe sellisel määral, et bakteriaalne biofilm võib seene halvata (Bolwerk jt., 2003). *P. chlororaphis* PCL1391 toodab fungitsiidset fenasiin-1-karboksamiidi (PCN), mille sünteesimine on reguleeritud autoinduktori C₆-HSL (N-heksanoüül-L-homoseriinlaktoon) hulgatunnetussüsteemi kaudu (Chin-A-Woeng jt., 2001). Viimast soodustab *P. chlororaphis*'e võime moodustada taimejuurel biofilmi (Bolwerk jt., 2003). Taimepatogeen *F. oxysporum* toodab mükotoksiini — fusaarhapet. Fusaarhape surub maha PCN-i

sünteesi ning võib piirata *P. chlororaphis*'e biokontrolli tõhusust (van Rij jt., 2005). Bakteri *P. fluorescens* WCS365 jaoks on fusaarhape peamine kemoatraktant, mis toob bakteri lähemale seenehüüfi eritatud toitainetele (de Weert jt., 2004).

Risosfääri koloniseerimisel on oluline bakterirakkude stressitaluvus ja toitainete kättesaadavus (Matilla jt., 2007). Risosfääris on enim ekspresseeritud geenid, mis on seotud kohanemisega ning toitumisega, nagu näiteks aminohapete omastamine ja aromaatsete ühendite metabolism. *P. putida*'l KT2440 on palju ABC-tüüpi aminohapete transportereid, mis rõhutab aminohapete metabolismi tähtsust olelusvõitluseks risosfääris (Nelson K. E. jt., 2002). *P. putida* KT2440 genoom kodeerib 350 välis- ja tsütoplasma membraani transportereid erinevate substraatide sissevõtuks/väljutamiseks. Tüvel KT2440 on kirjeldatud 11 LysE perekonna transportereid, mis viivad aminohappeid rakust välja. See viitab vajadusele vähendada aminohapete hulka rakus, vältimaks bakteri kasvu vähenemist või siis on need transporterid seni tundmata molekulide transportimiseks (Silby jt., 2011). *P. putida* tüvel KT2440R on kirjeldatud kemotaksist 15 aminohappe suhtes, kuid puudub seos kemotaksise ja aminohapete tarbimise vahel (Corral-Lugo jt., 2016). Tomati juureeritistes on küll aminohappeid, kuid liiga madalas kontsentratsioonis, et omada tähtsust toitainetena. Tomati juuretipu koloniseerimiseks peab *P. fluorescens* WCS365 suutma ise sünteesida aminohappeid (Simons jt., 1997).

Pseudomonas'tel sarnaselt teiste bakteritega on liikumine oluline nii elusale kui ka elutule pinnale seondumiseks. Taimejuurtele kinnitumise alustamiseks on vajalik viburite osalus (Turnbull jt., 2001). Viburitega liikuva bakterid on juure tipu koloniseerimisel edukamad kui viburiteta mutandid (Simons jt., 1996). Juure pinnale seondumise järel pärsitakse viburi geenide avaldumine. Kuid kui bakterikoloonia on kasvanud teatud suuruseks, taastub rakkude viburitega liikumine maatriksisiseselt ning rakud võivad ka kolooniast eralduda (Cárcamo-Oyarce jt., 2015).

Lisaks liikuvusele, mis lubab kemotaksist juuretipu suunas, on üheks väga oluliseks faktoriks mikroobi kinnitumisvõime, mis laseb tal jääda ühte kohta pikemaks ajaks. *P. putida* tüve KT2440 seondumine seemnetele sõltub tugevalt pinnavalkudest (Espinosa-Urgel jt., 2000; Martínez-Gil jt., 2010). *P. putida* tüve KT2440 geenid PP0168 ja PP0806 kodeerivad adhesioonivalke LapA ja LapF, mis on vajalikud seemnepinna hõivamiseks koos biofilmi moodustumisega ja seega *P. putida* eluks risosfääris (Espinosa-Urgel jt., 2000).

1.3. Biofilm ja selle olulisus

Biofilm on bakterite levinud paikne eluviis, mida iseloomustab bakterite pinnale ja üksteise külge kinnitumine (O'Toole jt., 2000; Flemming jt., 2016). Biofilmis on bakterirakud ümbritsetud ekstratsellulaarse polümeerse maatriksiga, mille kõige tüüpilisemateks komponentideks lisaks veele on valgud, nukleiinhapped ja eksopolüsahhariidid (Branda jt., 2005). Maatriksi komponendid võivad olla struktuurse tähtsusega, aidates maatriksit koos hoida. Samas võib maatriksil olla ka varuainete tähtsus, mille tõttu biofilmi maatriksis võib esineda ka ensüüme (Flemming ja Wingender, 2010). Lisaks sellele on maatriksil veel vähemalt kaks otstarvet: pakkuda biofilmile tugevust ja stabiilsust ning kaitsta rakke välismõjude eest. Maatriks on kaitsekilp toksiinide ja raskemetallide (Teitzel ja Parsek, 2003), antibiootikumide (Høiby jt., 2001) ja kiskjate vastu (Davey ja O'Toole, 2000). Biofilmis on bakterid märkimisväärselt vastupidavamad kuivusele ja soolsusele (Le Magrex-Debar jt., 2000) ning biofilm pakub kaitset ka UV-kiirguse (Espeland ja Wetzel, 2001) ja happe mõju eest (McNeill ja Hamilton, 2003). Biofilmi moodustumine aitab bakteritel püsima jääda toitainerikkasse keskkonda, samas hõivata uusi ökonišše, kui mikroorganismid eralduvad kolooniast (Hall-Stoodley jt., 2004). Bakterite kohanemine eluks nii iseseisvana kui ka biofilmi kujul on võimaldanud neil koloniseerida suurema osa meie planeedist ning siinsetest eluvormidest.

Inimühiskonna seisukohalt on esile toodud pigem biofilmi negatiivset tähtsust. Näiteks, meditsiinilistel vahenditel nagu kateetritel ja implantaatidel esinev biofilm põhjustab infektsioone, mille ravi on keeruline ja kallis. Biofilmis on bakterid 10 kuni 1000 korda vähem tundlikud antibiootikumidele kui vabalt elavad liigikaaslased, mis põhjustab kauakestvat keerulist ravi (Davies 2003).

Bakteriaalne biofilm võib põhjustada toiduainetööstuses toodangu saastumist, vähendades seeläbi toote säilivust või, olenevalt mikroobiliigist, ohustada inimeste tervist (Winkelströter jt., 2014). Biofilmis on bakterid äärmiselt vastupidavad desinfektsioonivahenditele ning seetõttu on vajalikud pikemad tootmistsükli katkestused seadmete ja pindade puhastamiseks.

Soovimatu biofilm tehnilistes seadmetes vähendab soojusülekande efektiivsust ja kiirendab korrosiooni (Little ja Lee, 2014).

Samas on võimalik bakteriaalset biofilmi kasutada inimeste hüvanguks. Nii saab korrosioonitõrjes rakendada kasulike bakterite biofilmi (Zuo 2007). Kuigi bakterid üldiselt saastavad joogivett (Wingender ja Flemming, 2011), siis biofilmi rakendamine biotehnoloogias

võimaldab puhastada joogivett, lagundada heitmeid ning isegi toota biokütust (Rosche jt., 2009; Halan jt., 2012). Mikroobid aitavad puhastada mulda saasteainetest (Segura ja Ramos, 2013). *P. putida* PCL1444 lagundab naftaleeni ning kaitseb raiheina seemneid ja seemikuid naftaleeni kõrge kontsentratsiooni eest (Kuiper jt., 2002). Bakter *Comamonas* sp KD7 koos valge ristikuga puhastab dioksiiniga saastunud pinnast (Wang ja Oyaizu, 2011).

Erinevad taimehaigused põhjustavad taimse saagi kaotust kuni 20% (Schumann ja D'Arcy, 2006). Looduslikult kasulike bakterite edukas taimejuurte hõivamine ja biofilmi moodustamine koos kahjulike organismide efektiivse tõrjumisega vähendab haigusjuhtude arvu või raskusastet.

Biofilmi uurimine, selle tekkest ja arengust täpsema ülevaate saamiseks, võimaldab mitte ainult kontrolli biofilmi moodustumise üle, vaid võib pakkuda ka asjakohast teavet bakteri ja eukarüooti vastasmõjude kohta. Taimede ja mikroobide (nii kasulike kui ka haigustekitajate) vastastikmõjus on kasutusel sageli samad mehhanismid, ehkki erinevas kombinatsioonis ning hoopis teise eesmärgiga (Lugtenberg jt., 2002). Suhtes erinevate eukarüootidega, nagu taim, seen ja inimene, kasutavad mikroobid sarnaseid strateegiaid (Lugtenberg ja Dekkers, 1999). Kaks *Pseudomonas*'e liiki tapavad eukarüooti sarnase strateegia abil: *P. chlororaphis* hävitab *Fusarium*'i, asustades seenehüüfe ja tootes fenasiin-1-karboksamiidi (Chin-A-Woeng jt., 2001), ning *P. aeruginosa* tapab nematoodi *Caenorhabditis elegans*, koloniseerides oma ohvri ja sünteesides (fenasiini derivaati) püotsüaniini (Mahajan-Miklos jt., 1999).

Eukarüootide suhtes bakteritega on patogeensuse ja mutualistlikkuse vaheline piir üsna õhuke. Eukarüootse peremehe koloniseerimise algses etapis kasutavad nii kahjutud kui ka patogeensed mikroorganismid sarnaseid mehhanisme, kusjuures ohutute bakterite mõned geenid sarnanevad patogeensete bakterite virulentsusfaktoritega. *P. putida* KT2440 tüvel puuduvad virulentsuseks vajalikud geenid, seega on ta sobiv mudelorganism, et uurida biofilmi kujunemist (Klausen jt., 2006).

1.4. *Pseudomonas putida* biofilm

Biofilmi võib jagada järgmisteks etappideks:

- 1) algse kontakti loomine,
- 2) pöördumatu kinnitumine pinnale,
- 3) mikrokoloonia ja maatriksi teke,
- 4) küps biofilm,
- 5) biofilmist irdumine.

Biofilmi areng sõltub teatud tingimustest, muuhulgas süsinikuallika tüübist ja hulgast, st bakter on võimeline biofilmi moodustumisega samaaegselt reageerima keskkonnamuutustele. On tõenäoline, et biofilmi teke ei käi jäiga programmi alusel, vaid bakter optimeerib pinna koloniseerimist vastavalt keskkonnale. Bakterite kleepuvust ja liikuvust on võimalik muuta vastuseks mikrokeskkonna ning ka bakterite endi poolt eritatud signaalidele (Klausen jt., 2006).

P. putida biofilmi maatriks sisaldab kõiki eelpool nimetatud tüüpilisi komponente, millest peamiseks on valk (Jahn jt., 1999). *P. putida* toodab adhesioonivalke LapA ja LapF. LapA on oluline pöördumatuks kinnitumiseks nii biootilisele kui ka abiootilisele pinnale (Gjermansen Morten jt., 2010; Moor jt., 2014; Ainelu jt., 2017), osaledes ka valmis biofilmis maatriksi komponendina. Bakteri suuruselt teine valk, LapF, on kirjanduse järgi seotud rakk-rakk interaktsioonidega, mikrokoloonia tekkega ning küpse biofilmi moodustumisega (Martínez-Gil jt., 2010) tõenäoliselt just raku pinna hüdrofoobsmaks muutmise tõttu (Lahesaare jt., 2016). LapA ja LapF-i puudumisel väheneb *P. putida* konkurentsivõime risosfääris, mida ei suuda kompenseerida ka suurenenud eksopolüsahhariidide tootmine (Martínez-Gil jt., 2013).

P. putida KT2440 ekspresseerib nelja eksopolüsahhariidi: alginaati *alg*-geenide ekspresseerumise abil, tselluloosi *bcs*-geenide, *putida* eksopolüsahhariid A *pea*-geenide ja *putida* eksopolüsahhariid B *peb*-geenide abil (Nilsson jt., 2011). Pea suurendab biofilmi moodustumist ja vähendab bakteri liikuvust (Ramos-González jt., 2016). Bakteri eluks risosfääris on olulised nii Bcs kui ka alginaat. Veepuuduse korral toodab *P. putida* alginaati, et hõlbustada niiskuse alalhoidmist biofilmis ning seeläbi suurendada bakterirakkude eluvõimet (Mortel jt., 2004; Chang jt., 2007). Kui *P. putida* ei ole võimeline alginaati sünteesima, siis seda kompenseerib Pea ja Bcs-i tavalisest suuremas koguses tootmine, oletatavasti biofilmi niiskussisalduse hoidmiseks (Nielsen jt., 2011). *P. putida*’l on kirjeldatud biofilmis lisaks valkudele ja polüsahhariididele veel

ekstratsellulaarsed DNA-d (Steinberger ja Holden, 2005), kuid see ei ole biofilmi maatriksi struktuuri püsimiseks oluline komponent (Yousef-Coronado jt., 2011; Moor jt., 2014).

Küpselt biofilmist võivad eralduda nii üksikud kui ka agregeerunud bakterirakud (Petrova ja Sauer, 2016). Toitainetepuudusest tingitud stressi korral *P. putida* biofilm laguneb kiiresti (Gjermansen jt., 2005). Toitainete nappuses alaneb biofilmi reguleeriva alarmooni c-di-GMP (tsüklilise diguanosiinmonofosfaadi) tase rakus (Gjermansen Morten jt., 2010). Seda langust tajub c-di-GMP retseptor LapD, mis muudab oma konformatsiooni ja vabastab enda küljest proteaasi LapG (Navarro jt., 2011; Newell jt., 2011). Vaba LapG lõikab LapA, vabastades selle raku küljest ja põhjustades rakkude eraldumise biofilmist (Gjermansen Morten jt., 2010; Navarro jt., 2011; Newell jt., 2011). Süsinikallikate vähesuse korral *P. putida* KT2442 geen *cbrB* surub alla biofilmi teket soodustavate geenide ekspressiooni ning soodustab bakteri kemotaksist toitainete suunas (Amador jt., 2010).

1.5. Globaalne regulaator Fis

Vabalt elava bakteri pinnale seondumine ja biofilmi moodustamine toob kaasa ümberkorraldused bakteri füsioloogias ning see omakorda tingib suure hulga geenide ekspressiooni muutumise (Sauer ja Camper, 2001; Sauer jt., 2002). Selles on tähtis osa nukleoidiga assotsieerunud valkudel, mis mõjutavad erinevate geenide avaldumist vastusena muutuvatele keskkonnatingimustele. Optimaalsetes tingimustes kasvavates bakterirakkudes on domineerivaks nukleoidiga seonduvaks valguks Fis (ingl *factor for inversion stimulation*) (Finkel ja Johnson, 1992; Beach ja Osuna, 1998; Ishihama, 2009). Umbes 11 kDa raskune homodimeere moodustav Fis võib DNA-ga seondudes viimast painutada 40° kuni 90°, ning mõjutada transkriptsiooni, replikatsiooni ja DNA topoloogiat (Pan jt., 1996; Ishihama, 2009). *E. coli* logaritmilise kasvufaasi rakkudes võib Fis valgu hulk küündida 60 000 molekuni raku kohta, samas statsionaarsesse faasi jõudnud rakkudes on Fis vaevu tuvastatav, alla 100 molekuli raku kohta (Finkel ja Johnson, 1992; Ball jt., 1992; Ali Azam jt., 1999). Seega on Fis vajalik enterobakterites just kasvavates rakkudes vastavate geenide transkriptsiooniks ja DNA replikatsiooniks (Ali Azam jt., 1999). Transkriptsiooni regulaatorina mõjutab Fis geenide ekspressiooni, mis on seotud translatsiooniga (rRNA ja tRNA geenid), kemotaksisega, energia ja toitainete metabolismi ning transpordiga

(Finkel ja Johnson, 1992; Ishihama, 2009). Lisaks *E. coli*'le on paremini teada Fis-i osalus taimepatogeensetes bakterites perekonnast *Dickeya*. Fis soodustab *Dickeya zea* virulentsust ja biofilmi moodustumist, liikuvust ja kemotaksist ning inhibeerib ekstratsellulaarsete polüsahhariidide tootmist (Lv jt., 2018). Fis-i mõju enterobakterite geeniekspressioonile on tuvastatud võrdluses metsiktüve ja *fis*-i deletsiooniga tüve vahel. *P. putida* jaoks on Fis ilmselt väga oluline regulaator, kuna ei ole õnnestunud luua *P. putida fis*-i deletsiooniga tüve (Teras jt., 2009; Jakovleva jt., 2012). *P. putida* Fis-il on biofilmi moodustumist soodustav (Moor jt., 2014) ja bakteri liikuvust vähendav (Jakovleva jt., 2012) mõju *fis*-i üleekspressiooni tingimustes. Fis represseerib *E. coli*'s enda sünteesi, seondudes oma promootoralaga (Ball jt., 1992). Statsionaarsesse faasi jõudvas *E. coli*'s represseeritakse tugevasti Fis valgu sünteesi, mille tõttu Fis-i tase langeb rakus järsult 500-1000 korda (Ball jt., 1992; Ali Azam jt., 1999). *P. putida*'s jääb Fis-i hulk kiirelt kasvavates rakkudes madalamale tasemele võrreldes *E. coli*'ga ning statsionaarses faasis on langemine ka vähem järsk, alanedes kaks kuni kolm korda (Yuste Luis jt., 2005).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärk

Meie laboris uuritakse *P. putida* biofilmi moodustumist ja globaalse regulaatori Fis-i osa selles. Eelnevatest töödest on selgunud, et *fis*-i üleekspressioon soodustab biofilmi teket LB täissöötmes (Moor jt., 2014), kuid mitte M9 glc CAA söötmes (Hanna Ainelu avaldamata andmed). Sellest johtuvalt püstitati hüpotees, et *fis*-i üleekspressiooni *P. putida* biofilmi võimendav efekt sõltub keskkonnas olevatest faktoritest ehk söötmekomponentidest. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas Fis-i biofilmi soodustav toime sõltub söötmekomponentidest ning millised söötmekomponendid mõjutavad nn Fis-i efekti.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Bakteritüved, söötmed ja plasmiid.

Baktereid kasvatati Luria-Bertani (LB) söötmes (Miller 1992), mis sisaldas NaCl (10 g/l), pärmiekstrakti (5 g/l) ja trüptooni (10 g/l) ning defineeritud M9 glc CAA söötmes, mis sisaldas M9 puhvrit (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl), mikroelementide lahust (2,5 ml/l), glükoosi (lõppkontsentratsiooniga 0,2 %) ning 0,4 % kaseiini hüdrolysaati (CAA) koos täiendava L-trüptofaaniga (20 µg/ml). Tardsöötme valmistamiseks lisati agarit 15 g/l. Selektioonimarkerina kasutati gentamütsiini (Gm, 10 µg/ml), streptomütsiini (Sm, 200 µg/ml) ja penitsilliini (Pn, 1500 µg/ml). *P. putida* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C. Vedelsöötmetes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil (180 pööret/min). *P. putida* F15 rakkudes Fis-i üleekspressiooniks lisati söötmesse IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1 mM). Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiid on ära toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiid.

<i>Pseudomonas putida</i> tüvi	iseloomustus	allikas
PSm	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7- Ω Sm1 (Sm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
F15	PaW85; mini-Tn7- Ω Gm-term- <i>lacI</i> ^q -P _{tac} - <i>fis</i> -T1T2 (Gm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
PSm Δ lapA	PSm; Δ PP0168 (Sm ^r)	(Moor jt., 2014)
F15 Δ lapA	F15; Δ PP0168 (Gm ^r)	(Moor jt. 2014)
Plasmiid		
p9TTB-lapA 1-8	Promootorita <i>lacZ</i> geeni ette on kloonitud 951 aluspaari pikkune <i>lapA</i> promootorala, mis sisaldab kõiki kuut <i>lapA</i> promootorit ja mõlemat kahte Fis-i seondumisjärjestust (Pn)	(Ainelo jt., 2017)

Erinevate söötmekomponentide võrdluskatsetes kasutatud M9 defineeritud söötme lisandid on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud M9 defineeritud söötme lisandid.

söötmelisand	Proteolüütiliselt töödeldud valk	tootja
1.trüptoon	kaseiin	LabM
2.trüptoon	kaseiin	Amresco
1.peptoon	kaseiin	Amresco
2.peptoon	sojauba	Acros Organics
3.peptoon	želatiin	Sigma-Aldrich
pärmiekstrakt	pärmirakud	LabM

2.2.2. Kompetentide valmistamine ja elektroporatsioon.

P. putida rakud kasvatati ette üleöö 5 ml LB vedelsöötmes ning tsentrifuugiti 90 sekundit täispöoretel (13000 rpm). Rakke suspendeeriti 1 ml 300 mM sahharoosiga ning tsentrifuugiti. Tegevust korrati kolm korda. Seejärel suspendeeriti rakke 500 μ l sahharoosiga. 50 μ l kompetentidele lisati 20 ng plasmiidset DNA-d (p9TTB-lapA 1-8) ja pipeteeriti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon teostati firma BioRad elektroporaatoriga „*E. coli* pulser“ pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist välja 1 ml LB-ga ning kasvatati vedelsöötmes

temperatuuril 30 °C 45 minutit. Seejärel rakud tsentrifuugiti vedelsöötmes välja ning plaaditi (penitsilliini sisaldavale) LB tardsöötmele.

2.2.3. B-galaktosidaasi eriaktiivsuse määramine

P. putida rakke kasvatati vedelsöötmes penitsilliini juuresolekul 18 tundi. Bakterirakkude tihedus mõõdeti lainepikkusel 580 nm spektrofotomeetriga LibraS35. Eppendorfi tuubis (1,5 ml) segati kokku reaktsioonisegu, mis sisaldas: 800 µl Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 28 mM β-merkaptotetanool; pH 7), 50 µl kloroformi ja 50 µl rakke. Reaktsioon käivitati 200 µl ONPG (orto-nitrofenüül- β-D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) lisamisega. Reaktsioon peatati 500 µl 1M Na₂CO₃ lisamisega ning fikseeriti reaktsioonile kulunud aeg. Seejärel mõõdeti orto-nitrofenooli neeldumine lainepikkusel 420 nm ning lüüsunud rakkude tihedus lainepikkusel 550 nm.

B-galaktosidaasi eriaktiivsus E arvutati valemiga:

$$E = 1000 \frac{OD1 - 1,75 \times OD2}{T \times V \times OD3}$$

kus OD1 on lainepikkusel 420 nm mõõdetud orto-nitrofenooli neeldumine, OD2 on 550 nm juures mõõdetud lüüsunud rakkude tihedus ja OD3 on 580 nm juures mõõdetud rakutihedus, T on reaktsiooniaeg minutites ja V on reaktsioonis kasutatud bakterikultuuri maht milliliitrites.

2.2.4. Biofilmi moodustumise mõõtmine.

P. putida rakud kasvatati ette üleöö vedelsöötmes, mis sisaldas antibiootikumi (vastavalt tüvele streptomütsiini või gentamütsiini). Biofilmi moodustamiseks külvati rakud mikrotiiterplaadile (Greiner bio-one 655101), arvestusega iga kannu kohta 5 µl rakke ja 100 µl värsket söödet, kusjuures antibiootikumi enam ei lisatud. F15 tüves *fis*-i üleekspressiooni indutseerimiseks lisati ühele variandile IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1mM). Rakke kasvatati 30 °C termostaadis ja biofilmi hulka mõõdeti 4 või 24 tunni möödudes.

Biofilmi hulga hindamiseks värviti see kristallvioletiga. Selleks lisati mikrotiiterplaadi kannu kohta 25 µl 1%-list kristallvioleti vesilahust ja lasti värvuda 15 minutit. Seejärel eemaldati raku-värvisegu ning kannu pesti 150 µl destilleeritud veega kolm korda. Biofilmist värvi eraldamiseks hoiti mikrotiiterplaadi kannus 180 µl 96% etanooli viis minutit ning värvunud etanool

pipeteeriti teisele mikrotiiterplaadile. Seda korrati ning värvunud etanool tõsteti kokku ühele mikrotiiterplaadile. Värvunud etanool lahjendati destilleeritud veega (1:2). Saadud lahuse optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 540 nm spektrofotomeetriga Tecan Sunrise.

2.2.5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-iga kontrolliti tüvede õigsust. *Fis* geeni üleekspressiooni kasseti olemasolu kontrolliti praimeritega FisBamHI ja Prtac, geeni *lapA* deletsiooni kontrolliti praimeritega lapA-rev, lapA-IV ja PP0168-2-rev. Kasutatud oligonukleotiidid (praimerid) on kirjeldatud tabelis 3. PCR-il kasutati matriitsDNA-ks bakterirakkudest termilise töötlemisega vabanenud DNA-d. Reaktsioonisegu maht oli 30 µl. Reaktsioonisegu sisaldas: 1 x PCR-puhvrit (75 mM Tris HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM tartrasiin, 0,5% Ficoll 400), 0,2 mM dNTP, 10 pmol mõlemat praimerit, 1 ühik Taq polümeraasi, vett vajaliku mahuni ning bakterirakke. PCR-i teostamiseks kasutati firma Biometra PCR-i masinat.

PCR-i viidi läbi 25 tsüklit järgmistel tingimustel:

1. denaturatsioon 96 °C 60 sekundit,
2. praimerid seonduvad 58 °C 60 sekundit,
3. DNA süntees 72 °C 60 sekundit

Tabel 3. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Praimer	Järjestus 5'- 3' suunas	Seonduvakoht
Prtac	AATTAATCATCGGCTCGTATAA	78-100 nukleotiidi <i>fis</i> geeni algusest ülespoole
FisBamHI	AGAGGATCCTTACAACAAGTCGTACTGC	19 - 1 nukleotiidi <i>fis</i> geeni lõpust suunaga geeni alguse poole
lapA-rev	TGGATCCGACAATGCTTTTGACGATGG	17-36 nukleotiidi <i>lapA</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
lapA-IV	AGGATCCATCAATGTGACATTACATTGC	180-200 nukleotiidi geeni algusest ülesvoolu suunaga geeni alguse poole
PP0168-2-rev	TTGAATTCACTCCCACGCAATGCG	683-665 nukleotiidi <i>lapA</i> geeni lõpust allavoolu suunaga stopkoodoni poole

2.2.6. Geelektroforees

PCR-i tulemusi analüüsi geelektroforeesil. Selleks lisati 7 µl-le PCR-i reaktsioonisegule 2 µl foreesivärvi (0,04%-line broomfenoolsinise lahus 50%-ses glütseroolis) ja kanti need proovid horisontaalsele 1%-lisele agarosgeelile 1xTAE puhvril (50 mM Trisatsetaat; 1mM EDTA, pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkonsentratsiooniga 0,33 µg/ml. Geelile kanti ka firma Fermentas DNA suurusmarker. Elektroforees toimus pingel 130 volti. Seejärel visualiseeriti DNA-d geeli pildistamisega UV valguses.

2.2.7. Statistiline analüüs

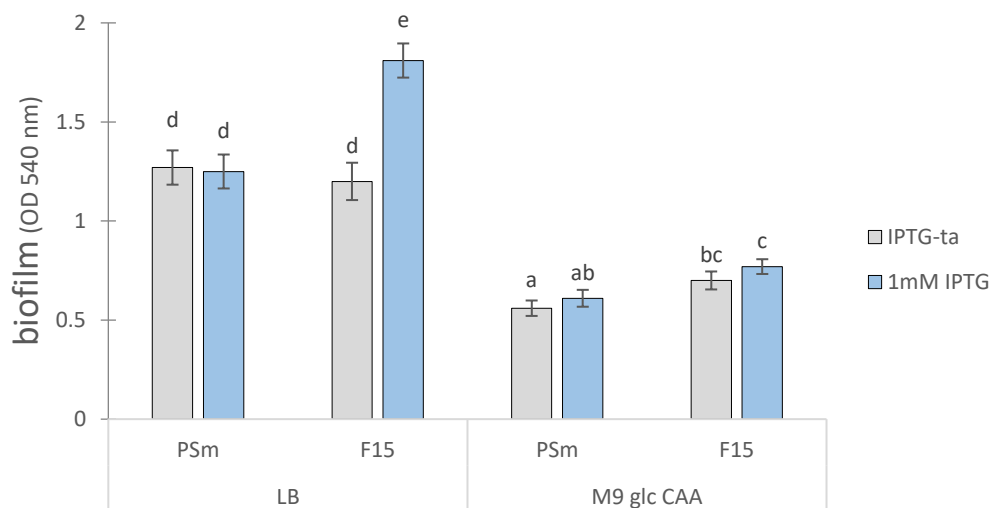
Statistiliseks analüüsiks kasutati paketti Statistica 13.3. Tulemusi analüüsi faktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused arvutati PostHoc-na Bonferroni testiga. Selle töö joonistel on näidatud tulemuste aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed märgivad statistiliselt mitteolulisi erinevusi ($p > 0,05$) keskmiste väärtuste vahel.

2.3. Tulemused

2.3.1. *P. putida* biofilm LB-täissöötmes ja M9 glc CAA söötmes

Meie labori eelnevatest töödest oli teada, et globaalne regulaator Fis soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist LB-täissöötmes (Jakovleva jt., 2012), kuid mitte M9 glc CAA defineeritud söötmes. Sellest tulenevalt kontrolliti varasemaid andmeid ning korraldati katset *P. putida* kahe tüvega: metsiktüvega PSm ja *fis*-i ülekspressioonitüvega F15. Viimasel tüvel on võimalik *fis*-i üle ekspresseerida IPTG lisamisega söötmesse, kuna *fis*-i geen on P_{tac} kontrolli all.

Sarnaselt varasematele katsetele soodustas *fis*-i ülekspressioon biofilmi moodustumist LB söötmes (joonis 1). *P. putida* F15 biofilm IPTG-ga variandil oli umbes 1,5 korda kõrgem kui IPTG-ta kasvanud F15-l (joonis 1). M9 glc CAA söötmes *fis*-i ülekspressioonil biofilmile mõju ei olnud. Samuti ei mõjutanud IPTG metsiktüve biofilmi moodustumist.



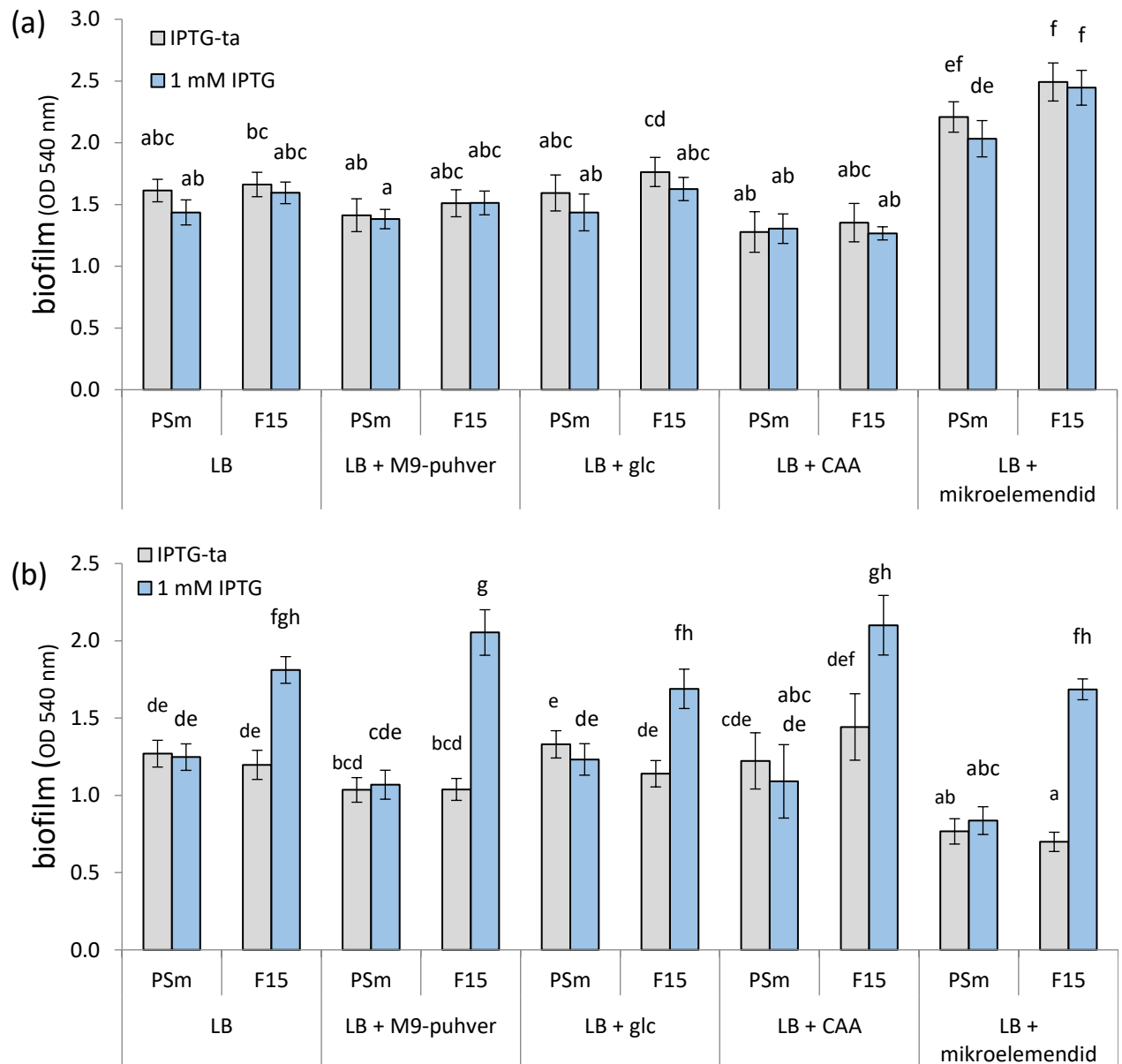
Joonis 1. *P. putida* tüvede PSm ja F15 24 tunni biofilm LB ja M9 glc CAA söötmes, mis on kasvanud IPTG-ta või 1 mM IPTG juuresolekul. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse (kaheksa paralleeliga) keskvaartused koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Homogeensusrühmade ühesugused tähed märgivad statistiliselt mitteolulisi erinevusi ($p > 0,05$) keskmiste väärtuste vahel.

2.3.2. M9 glc CAA söötme komponentide mõju *P. putida* biofilmile

Kuna LB söötmes on *fis*-i üleekspressioonil biofilmi soodustav efekt ja M9 glc CAA söötmes ei ole, siis tekkis küsimus, kas mõni M9 glc CAA komponent pärssib *fis*-i üleekspressiooniga tüvel biofilmi moodustumist või mõni LB söötme komponent soodustab. Selle tuvastamiseks lisati LB-sse ükshaaval M9-söötme komponente, M9-puhver, mikroelemendid (2,5 ml/l), glükoos (lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ja 0,4% CAA koos täiendava trüptofaaniga (20 µg/ml), samas kontsentratsioonis nagu nad M9 söötmes esinevad. Meie labori varasematest töödest on teada, et *P. putida* rakkude kasvades LB söötmes on Fis valgu hulk suurim neljandal tunnil peale ümberkülvi värskesse söötmesse (Velts 2010) ja *fis*-i üleekspressiooni biofilmi soodustav efekt on märgatav statsionaarses faasis (Moor jt., 2014), siis mõõdeti biofilmi nii 4 kui 24 tunni möödudes.

Selles töös saadi, et *P. putida* uuritud tüved moodustasid neljandal tunnil sarnaselt biofilmi ega erinenud statistiliselt (joonis 2a). Lisatud IPTG ei avaldanud tüvedele mõju statistiliselt olulisel määral (joonis 2a). See on kooskõlas varasemate tulemustega, mis näitavad, et Fis-i loomuliku kõrge taseme juures eksponentsiaalse faasi rakkudes *fis*-i üleekspressioonil biofilmile lisaefekti ei ole.

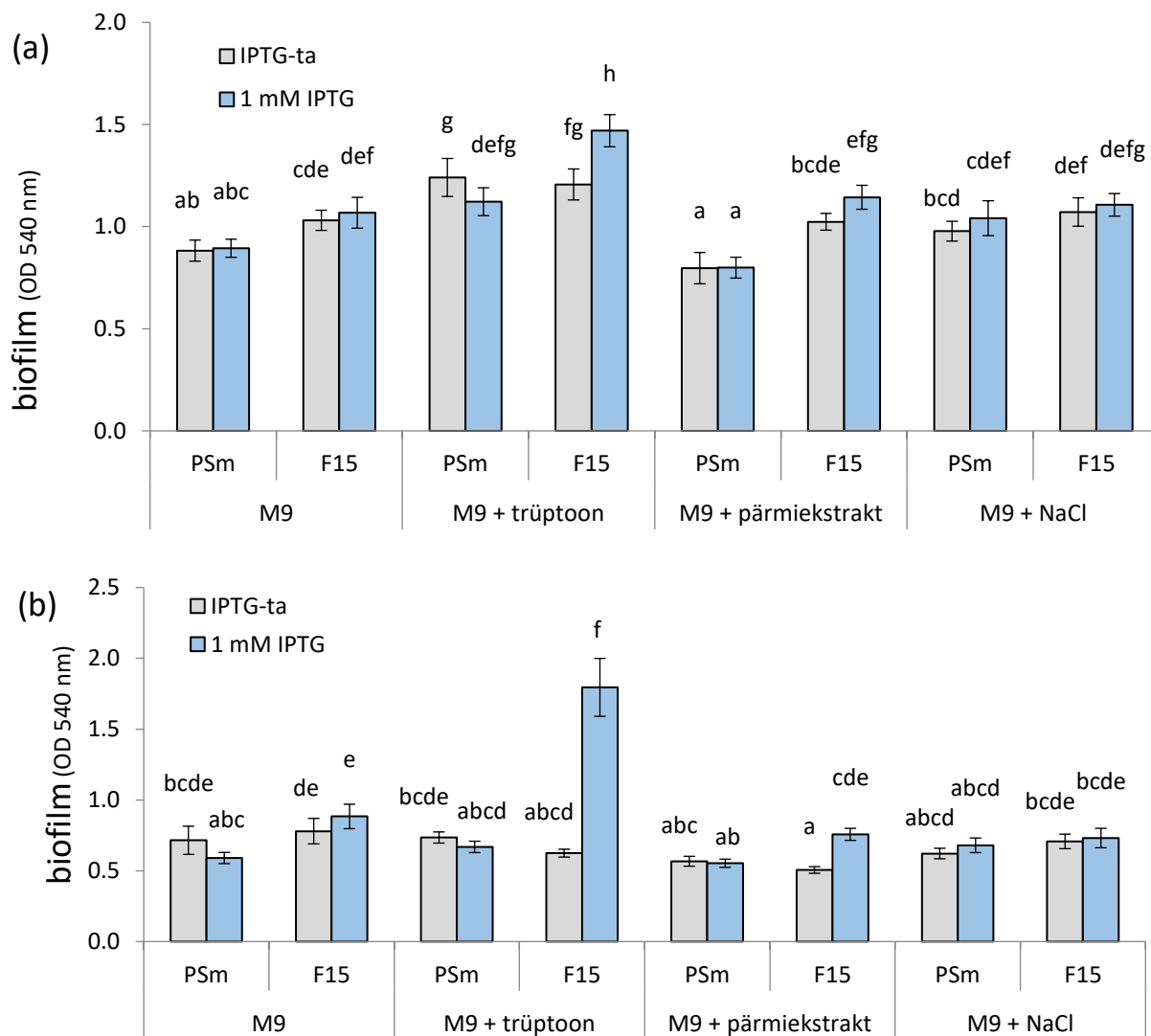
Kui vaadelda 24-tunni biofilme, siis kõikidel variantidel säilis *fis*-i üleekspressiooni soodustav efekt *P. putida* biofilmile, vaatamata lisatud M9 söötme komponendile (joonis 2b). Järelikult M9-söötme komponendid iseenesest ei pärssi rohke Fis-iga indutseeritud biofilmi kujunemist. Seega võib *fis*-i võimendav efekt tuleneda mõnest LB komponendist. Samas ilmnes ootamatu efekt, söötmesse lisatud mikroelemendid vähendasid biofilmi üldist hulka nii PSm-il kui (võrreldes PSm LB IPTG-ta ja PSm LB+mikroelemendid IPTG-ta $p < 0,001$) ka F15 variandil kuhu ei lisatud IPTG-d ($p < 0,001$; joonis 2b).



Joonis 2. *P. putida* tüvede PSm ja F15 biofilmi moodustumine LB-s, millele oli lisatud M9 defineeritud söötme komponente: M9-puhvrit (LB+M9-puhver), 0,2% glükoosi (LB+glc), 0,4% CAA-d (LB+CAA) ja 2,5 ml/l mikroelemente (LB+mikroelemendid). Biofilmi mõõdeti nii 1 mM IPTG juuresolekul kui puudumisel LB söötmes inokuleerimisest 4 tunni (a) ja 24 tunni (b) järel. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse (kokku vähemalt 24 paralleeliga) keskvärtused koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega.

2.3.3. LB söötme komponentide mõju *P. putida* biofilmile

Selgitamaks, kas Fis-i biofilmi soodustav toime võib olla tingitud mõnest kindlast LB-söötme komponendist, võrreldi *P. putida* biofilmi moodustumist M9 glc CAA söötmes, kuhu lisati ühekaupa ja samas kontsentratsioonis LB komponente (5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl-i ja 10 g/l trüptooni), kui on LB-söötmes. Kui võrrelda 4-tunni biofilmi, siis ühegi LB komponendi lisamisel ei tekkinud tugevat *fis*-i ülekspressiooni biofilmi soodustavat mõju (joonis 3a).



Joonis 3. *P. putida* biofilmi moodustumine M9 glc CAA söötmes (M9) lisatud LB-komponentidega: trüptoon (10 g/l), pärmiekstrakt (5 g/l) ja NaCl (10 g/l). Graafikul on biofilmi mõõtmistulemused 4 tundi (a) ja 24 tundi (b) peale söötmevariantide inokuleerimist PSm ja F15 rakkudega nii 1 mM IPTG juuresolekul kui puudumisel. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse keskvärtused (kaheksa paralleeliga) koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusgruppidega.

See oli ootuspärane, kuna eelnevalt oli teada, et *fis*-i üleekspressioonil pole 4-tunni biofilmile LB-s mõju (joonis 2a; Moor jt., 2014). Ainus komponent, millel oli statistiliselt oluline positiivne efekt IPTG-ga kasvanud F15-e 4-tunni biofilmile, oli trüptoon (joonis 3a). Samas, 1mM IPTG lisamine suurendas F15 biofilmi ainult 1,2 korda, mille tõttu ei pruugi efekt olla bioloogiliselt oluline.

24-tunni biofilme võrreldes selgus, et *fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt avaldub M9 söötmes sarnaselt LB-ga siis kui M9 söötme lisandina kasutati trüptooni (joonis 3b). Pärmiekstrakti ega NaCl-i lisamine ei andnud *Fis*-i sellist võimendavat efekti biofilmile nagu eelnevalt on nähtud LB söötmes (joonis 3b). Siiski, pärmiekstrakti lisamine suurendas F15 biofilmi statistiliselt olulisel määral, kui võrrelda F15 biofilmi IPTG-ta ja IPTG-ga variandil ($p < 0,001$). Samas, pärmiekstrakti lisamine ei taastanud F15 *fis*-i üleekspressiooni tugevat biofilmi võimendavat efekti nagu see toimub LB-s (joonis 2b ja 3b), järelikult *Fis*-i biofilmi soodustav toime LB-s on seotud trüptooniga.

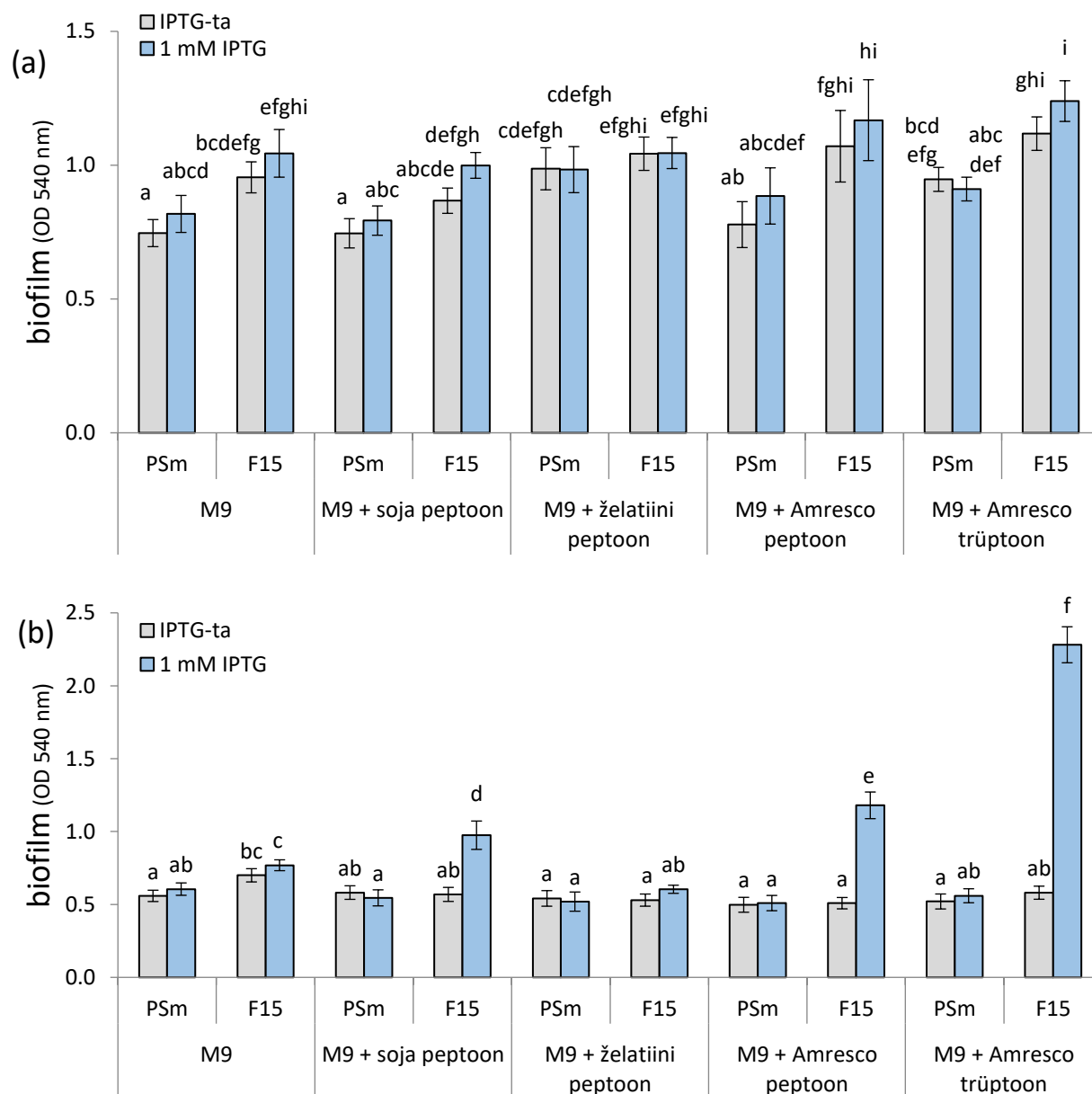
2.3.4. Trüptooni ja peptoonide mõju *P. putida* biofilmi moodustumisele

LB-s sisalduv ja eelmises katses M9 glc CAA söötmesse lisatud trüptoon oli sama toode, valmistajaks LabM. Sellest tekkis küsimus, kas *fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt säilib ka teist päritolu ensümaatilisel lagundatud valkude korral. Vastuse leidmiseks mõõdeti biofilmi kujunemist M9 glc CAA söötmetes, millest igaüks sisaldas erinevat trüptooni (Amresco) või peptooni (Amresco, Acros Organics, Sigma-Aldrich) vastavas kontsentratsioonis. Kasutatud lisandid ja nende tootjad on esitatud metoodika osa tabelis 2.

Nelja tunni biofilme võrreldes selgus, et F15 biofilm ei sõltunud uutest lisanditest söötmes (joonis 4a) ning *fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt puudus kasutatud söötmevariantides sarnaselt LabM trüptoonile (joonis 2b). PSm moodustas biofilmi võrreldavas koguses kõigis söötmevariantides ega sõltunud IPTG-st (joonis 4b).

Üldjoontes trüptooni või peptooni lisamine nn M9 söötmesse taastas *Fis*-i võimendava efekti *P. putida* 24-tunni biofilmile, välja arvatud želatiini peptooni lisamisel (joonis 4b). IPTG-ga indutseeritud *fis*-i üleekspressioon võimendas F15 biofilmi soja peptooni lisamisel 1,7 korda (F15 1 mM IPTG / F15 IPTG-ta), Amresco kaseiini peptooniga söötmes 2,3 korda, Amresco kaseiini trüptooni kasutamisel võimendus biofilm 3,9 korda (joonis 4b), mis on sarnane LabM trüptooni 2,9 kordse võimenduseefektiga (joonis 3b). Želatiinist saadud peptooniga söötmes F15-l *fis*-i

biofilmi võimendavat efekti ei tekkinud ($p=1$; joonis 4b). Üldiselt on *fis*-i biofilmi võimendav efekt taastatav M9 glc CAA söötmele trüptooni/peptooni lisamisega.

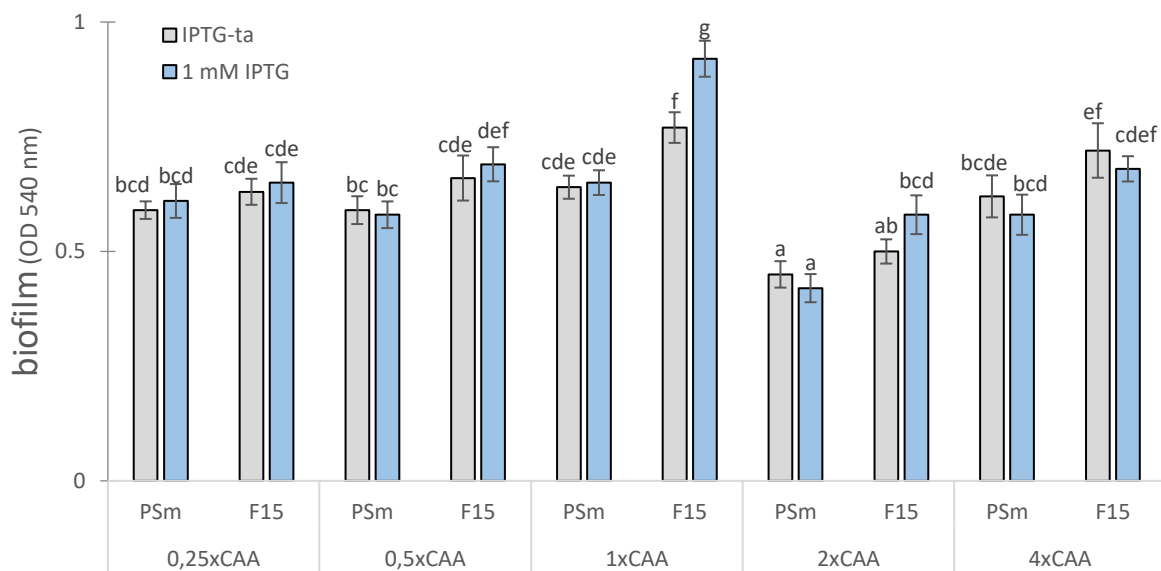


Joonis 4. *P. putida* PSm ja F15 tüvede biofilmi kujunemine 4 tunni ja 24 tunni jooksul M9 glc CAA söötmes (M9) koos erinevat päritolu peptoonide ja trüptooniga. Biofilmi mõõdeti nii 1 mM IPTG juuresolekul kui puudumisel. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse keskvaartused (kaheksa paralleeliga) koos 95% usalduspiiridega ja statistiliste homogeensusrühmadega.

2.3.5. Toitainete mõju *P. putida* biofilmi moodustumisele

Kuna trüptooni lisamine M9 söötmele põhjustas *Fis*-i biofilmi võimendava efekti tekke, siis tekkis küsimus, kas biofilmi võimendav efekt on tingitud sellest, et trüptooni lisamine annab söötmesse juurde süsinikuallikaid. Uurimaks süsinikuallika toime olemasolu ja mõju suunda *P. putida* biofilmile, lisati M9 söötmele täiendavalt CAA-d, mis arvutuslikult peaks vastama lisatud trüptooni süsinikule (2xCAA). Lisaks kasutati 2 korda kangemat CAA kontsentratsiooni kui peaks olema lisandina kasutatud M9+trüptooni söötmes (4xCAA), M9 söötmes oleva CAA kontsentratsiooni (1xCAA) ning 4 korda lahjemat (0,5xCAA) ja 8 korda lahjemat CAA kontsentratsiooni (0,25xCAA; joonis 5). Biofilmi mõõdeti 24 tunni järel, kuna *fis*-i üleekspressiooni efekt avaldub statsionaarse faasi rakkudes.

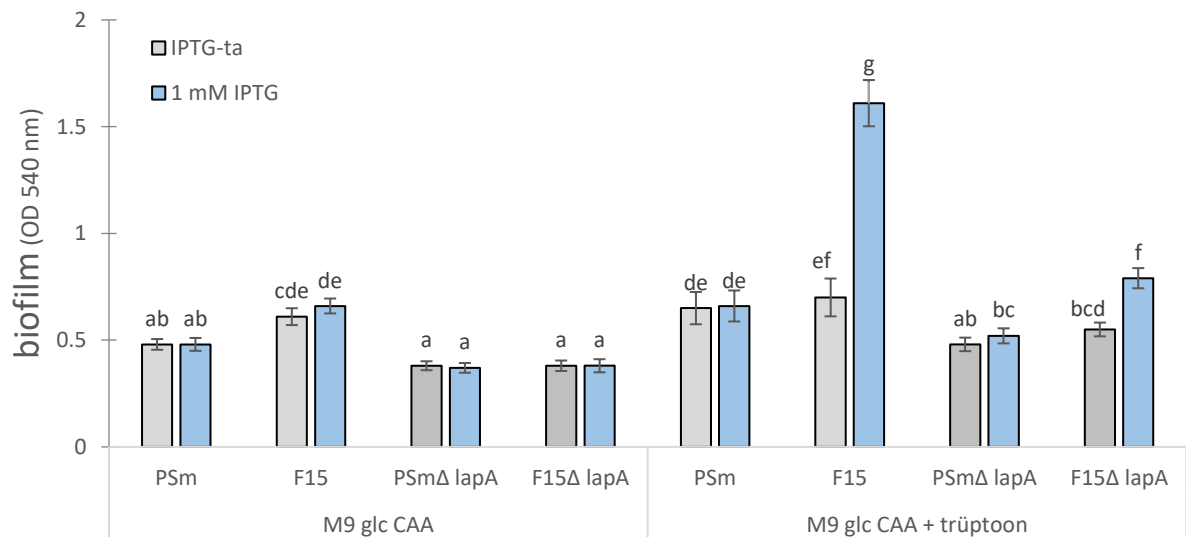
Ootuspäraselt ei mõjutanud IPTG metsiktüvel biofilmi moodustumist (joonis 5). Topeltkoguses CAA lisamine M9 söötmesse vähendab metsiktüve biofilmi hulka statistiliselt olulisel määral ($p < 0,001$). Trüptooniga võrdsustatud koguses aminohapete lisamine (joonis 5; 2xCAA) ei soodusta biofilmi teket *fis*-i üleekspressiooniga tüvel. Järelikult trüptooniga seotud biofilmi suurendav efekt ei ole vastus toitainete hulga suurenemisele.



Joonis 5. *P. putida* biofilmi moodustumine 24 tunni jooksul M9 defineeritud söötmes CAA erinevate kontsentratsioonide juures. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse keskväärtused (kaheksa paralleeliga) koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega.

2.3.6. Geeni *lapA* mõju *P. putida* biofilmi moodustumisele

Eelnevatest töödest oli teada, et *Fis* mõjutab *P. putida* biofilmi kujunemist LB-täissöötmele adhesioonivalgu LapA kaudu (Moor jt., 2014). Uurimaks, kas M9 glc CAA trüptooniga söötmele F15 tüve tugev biofilm on samuti seotud *lapA* ekspressiooniga, võrreldi biofilmi moodustumist tüvedel PSm ja F15 ning nende *lapA* deletsiooniga variantidel nii M9 glc CAA söötmes kui ka trüptooni manulusel (joonis 6).



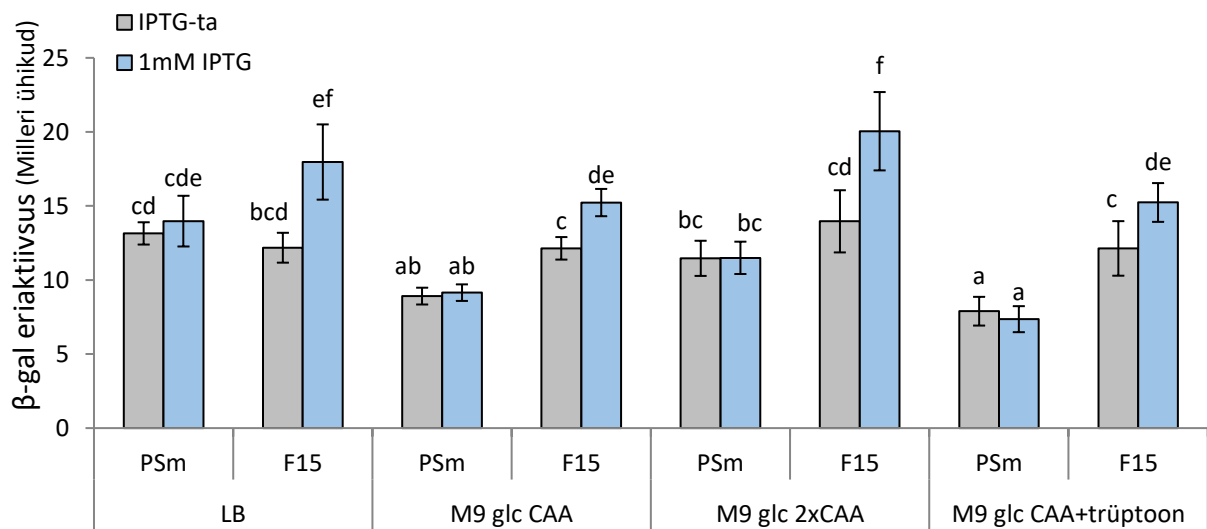
Joonis 6. *P. putida* biofilmi moodustumine PSm ja F15 ning *lapA* deletsiooniga tüvedel kahes söötmevariandis: M9 glc CAA ja M9 glc CAA trüptooniga (LabM). Biofilmi mõõdeti statsionaarse faasi rakkudel nii 1 mM IPTG juuresolekul kui puudumisel. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse keskväärtused (kaheksa paralleeliga) koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusgruppidega.

Sarnaselt eelmistele katsetele on näha, et trüptoon on vajalik selleks, et *fis*-i ülekspressioon suurendaks *P. putida* biofilmi moodustumist. Trüptooniga söötmes biofilmi moodustumise võrdlus *fis*-i ülekspressiooni tingimustes F15 tüve ja F15Δ*lapA* tüve vahel näitas, et *lapA* deleteerimine vähendab biofilmi hulka kaks korda ($p < 0,001$). Seega on *lapA* vajalik, et *Fis* soodustaks biofilmi moodustumist.

2.3.7. *P. putida* biofilmi seos *lapA* transkriptsiooniga

Varasemast oli teada, et Fis aktiveerib *lapA* transkriptsiooni (Ainelo jt., 2017). Sellest tekkis uus küsimus, kas biofilmi teket soodustavas söötmes kasvavates rakkudes on ka suurem *lapA* transkriptsioon. Geeni *lapA* transkriptsiooni mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsuse kaudu. Selleks viidi *P. putida* kompetentsetesse rakkudesse plasmidi p9TTB-*lapA*1-8, milles on 951 aluspaari pikkune *lapA* promootorala kloneeritud β -galaktosidaasi kodeeriva reportergeeni *lacZ* ette (Ainelo jt., 2017). β -galaktosidaasi substraadina kasutatakse sünteetilist ühendit ONPG (o-nitrofenüül β -D-galaktopüranosiid), mille β -galaktosidaas lagundab galaktoosiks ja o-nitrofenooliks. O-nitrofenool on kollase värvusega ühend ja selle teket on võimalik kvantitatiivselt spektrofotomeetri abil hinnata.

IPTG ei mõjuta metsiktüve β -galaktosidaasi eriaktiivsust ($p=1$; joonis 7). Üldiselt on F15 rakkudes IPTG juuresolekul β -galaktosidaasi aktiivsus kõrgem, st *fis*-i ülekspressioon suurendab *lapA* transkriptsiooni. Samas ei korreleeru see biofilmi mõõtmistulemustega vastavate söötmete korral: *fis*-i ülekspressioon suurendab *lapA* transkriptsiooni ka söötmetes, kus biofilmile efekti pole. See tähendab, et Fis-i võimendavat efekti biofilmi moodustumisele ei saa otseselt seostada *lapA* transkriptsiooniga.



Joonis 7. β -galaktosidaasi eriaktiivsus neljas erinevas söötmes kasvanud PSm ja F15 rakkudes. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse keskväärtused koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega.

2.4. Arutelu

Meie töögrupis uuritakse *P. putida* biofilmi kujunemist ning eelnevate töödega on näidatud, et *fis*-i üleekspressioon soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist LB täissöötmes, kuid mitte M9 glc CAA söötmes. Sellest tekkis küsimus, kas mõni söötme komponent mõjutab nn Fis-i võimendavat efekti *P. putida* biofilmile. Kuna katsed *fis* geeni rikkuda või deleteerida on olnud bakterile surmavad, siis kasutasin oma töös *fis*-i üleekspressiooniga tüve F15.

Oma uurimustöös leidsin, et *fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt on täheldatav küll LB-s kasvanud rakkude statsionaarses faasis, kuid puudub M9 glc CAA söötmes (joonis 1), mis kinnitas varasemaid tulemusi (Moor jt., 2014; Hanna Ainelu avaldamata andmed). Kuna tegemist on bakterirakkude jaoks kahe erineva kasvukeskkonnaga, siis oli võimalik kaks hüpoteesi: M9 glc CAA sööde või selle kindel komponent inhibeerib biofilmi teket või LB söötme osis võimendab biofilmi moodustumist. Leidsin, et M9 glc CAA söötme komponentide lisamine LB söötmele ei kaotanud ära *fis*-i üleekspressiooni biofilmi soodustavat efekti (joonis 2b). Järelikult biofilmi teket *fis*-i üleekspressiooni tingimustes M9 glc CAA söötmes ei pärsi sööde iseenesest. M9 glc CAA söötmesse LB koostisosade lisamisel taastus Fis-i sama tugev efekt, võrreldes LB-ga, kui M9-le lisati trüptooni (joonis 3b). Tähendab, M9 glc CAA söötmes on puudu see faktor, mis soodustab LB-s *fis*-i efekti avaldumist.

Lisaks LB söötmes kasutatud LabM trüptoonile oli Fis-i biofilmi soodustav toime märgata ka Amresco peptooni ja trüptooni ning sojast pärit peptooni korral (joonis 4b). Peptoonis leidub vabu aminohappeid, oligopeptiide, lipiide ja mikroelemente, kuid peptooni koostis on täpselt teadmata ning eri tootjate puhul erinev. Peptooni aktiivkomponentide ja toimemehhanismide määramatus muudab raskeks nende mõju hindamise. Pole teada, kas proteolüütiliselt töödeldud valgu kasulik efekt sõltub substraadina kasutatud valgu proteolüütilisest lagundamisastmest. On võimalik, et kasutatud peptoonides ja trüptoonides on peptiidid erineva pikkusega ning rohkem lagundatud substraat käitub kui aminohapete kogum ega oma struktuurset tähtsust *P. putida* biofilmi moodustumisel. Ilmselt on väga väikesed peptiidid nagu ka vabad aminohapped söötmes põhiliselt toidaineteks ega lase nn Fis-i võimendaval efektil biofilmile tekkida (joonised 4 ja 5). Samas pikemad peptiidid käituvad kui struktuurkomponendid *P. putida* biofilmi maatriksi kooshoidmisel ning LapA võimaldab tugevamat biofilmi, kui keskkonnas on pikkasid peptiide (joonised 4 ja 6).

Teisalt võib tegu olla konkreetse lisandi koostisega. Näiteks želatiinist pärit peptooni lisamisel ei tekkinud nn Fis-i võimendavat efekti. Tootja (Sigma-Aldrich) info kohaselt on želatiinist saadud peptoonis kõrge proliini sisaldus ja vähe väävli sisaldavaid aminohappeid nagu metioniin ja tsüsteiin. Kirjanduse andmetel on juureeritistes aminohappeid suhteliselt väheses kontsentratsioonis, kuid selle hulgas on põhiline proliin. *P. putida* suudab proliini tarbida C ja N allikana. Proliini üleminekut glutamaadiks katalüüsib *P. putida* üks ensümaatilise polüpeptiid, mida kodeerib *putA* geen (Vílchez jt., 2000). Seega proliin ei ole selles kontekstis pärssiva toimega. Mullabakterite kohta on pseudomoonastel küllaltki kiire kasvutempo, mistõttu on neil tõenäoliselt suur nõudlus kõigi aminohapete järele. Lisaks valgusünteesile on metioniin vajalik paljude sekundaarsete metaboliitide, sealhulgas hulgatunnetuse signaali — homoseriinlaktooni — prekursoriks (Zerbs jt., 2017). Sellest tulenevalt, želatiini peptoonis Fis-i võimendusefekti puudumine biofilmile võib olla tingitud peptoonis sisalduvate aminohapete/peptiidide erinevast vahekorra. Samas võib *P. putida* biofilmi mõjutada ka keskkonnas olev väävli hulk, mis võib reguleerida biofilmi.

Tekkis küsimus, kas bakter kasutas trüptooni/peptooni lisatoiteallikana ja seetõttu moodustus rohkem biofilmi. Arvutuslikult sisaldub LB-s kasutatud trüptoonis ja M9 söötmele kahekordses koguses lisatud CAA-s ühepalju aminohappeid. Samas kahekordne ega ka neljakordne CAA kontsentratsioon M9 söötmes ei taasta *fis*-i üleekspressiooniga tüvel biofilmi võimendavat efekti (joonis 5). Järelikult ei ole Fis-i mõju biofilmile tingitud otseselt kättesaadavatest aminohapetest (toitainetest). Lisaks kontrollisin rakkude kasvukiirust ning leidsin, et kasvu kiirus ei sõltu M9 glc CAA söötmesse lisatud aminohapete hulgast ega ka lisandina kasutatud trüptoonist (andmeid pole toodud), kuid muutus maksimaalne OD ehk maksimaalne biomass.

CAA saadakse kaseiini hüdrolüüsil ning see sisaldab aminohappeid ja vähe peptiide. Trüptoon on saadud kaseiini lõikamisel trüpsiiniga ja sisaldab peptiide, seega olulised võivad olla trüptooniga söötmesse lisandunud peptiidid. Meie labori varasematest töödest on teada, et pärast LB töötlust proteaasiga *fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav mõju ei avaldu. See toetab oletust, et *fis*-i üleekspressiooniga *P. putida* biofilmi moodustumist võib soodustada söötmes sisalduv valguline komponent, arvatavasti biofilmi maatriksit tugevdava struktuurse faktorina.

Kirjandusest on teada, et keskkond ja seal leiduvad toitained mõjutavad bakteri biofilmi kujunemist. Beauregard jt (2013) kirjeldasid taime teatud polüsahhariidide (taime rakukesta põhikomponendid) soodustavat mõju *Bacillus subtilis*'e biofilmi moodustumisele. *B. subtilis*'e

ekstratsellulaarse maatriksi põhikomponendid on eksopolüsahhariidid ja valk TasA. *B. subtilis* lagundab taime polüsahhariide ning kasutab saadud produkti oma maatriksi struktuuris. (Beauregard jt., 2013). Taime juureeritiste ja rakulüsaatide hulgas on samuti peptiide, mis võivad potentsiaalselt toimida *P. putida* biofilmi indutseerijatena või kasutatakse ära maatriksi struktuurikomponendina.

P. putida biofilmi valgulise maatriksi tähtsaim osa on adhesioonivalk LapA (Gjermansen Morten jt., 2010). Eelnevalt oli teada, et *fis*-i üleekspressioon suurendab LapA hulka 1,6 korda (Moor jt., 2014). Selgitamaks LapA osalust, võrdlesin biofilmi teket erinevates söötmetes PSm ja F15 ning *lapA* deletsiooniga tüvede vahel. Geeni *lapA* deleteerimine vähendas metsiktüve biofilmi 1,3 korda, sõltumata söötimest (joonis 6). M9 glc CAA söötmes F15 Δ *lapA* biofilmi väärtus oli 1,7 korda väiksem F15 vastavast väärtusest. See on kooskõlas kirjanduse andmetega, et *lapA* deletant moodustab metsiktüvest vähem biofilmi (Espinosa-Urgel jt., 2000; Hinsä jt., 2003; Moor jt., 2014). Geeni *lapA* deletsiooniga F15 tüve biofilm M9 glc CAA trüptooniga söötmes IPTG juuresolekul vähenes kaks korda võrreldes F15 tüvega (joonis 6). Seega Fis reguleerib biofilmi moodustumist LapA kaudu. Kirjanduse andmetel on LB-s kasvades *P. putida* *lapA* promootor aktiivsem kahel korral: väga varajases kasvufaasis ja rakkude jõudmisel statsionaarsesse faasi (Martínez-Gil jt., 2014). 18 tundi ettekasvatatud *P. putida* rakkudes mõõdetud *lapA* transkriptsioon (β -galaktosidaasi eriaktiivsuse kaudu) oli *fis*-i üleekspressiooni tingimustes üldiselt kõrgem kui metsiktüvel (joonis 7). Samas puudus seos Fis-i biofilmi võimendavat efekti näidanud söötmevariantidega. β -galaktosidaasi eriaktiivsus oli *fis*-i üleekspressioonitingimustes M9 glc CAA söötmes ja M9 glc CAA trüptooniga söötmes samal tasemel (joonis 7), aga biofilmi moodustus M9 glc CAA söötmes kaks korda vähem (joonis 3). Seega Fis küll soodustab *lapA* transkriptsiooni, kuid biofilmi moodustumisel on ilmselt tegemist post-transkriptsioonilise regulatsiooniga.

Kuigi katsete tulemus näitas peptooni/trüptooni soodustavat mõju biofilmile, viidates valgulise komponendi olulisusele, tuleks tööga jätkata. Selleks on plaanis lagundada laboris kaseiini trüpsiiniga nii, et tekiks erineva pikkusega peptiide, ning kontrollida, kas sellise lisandi panemisel M9 glc CAA söötmesse taastub nn Fis-i positiivne efekt *P. putida* biofilmile.

Kokkuvõte

Meie labori töödest on teada, et globaalse regulaatori *fis*-i üleekspressioon soodustab *Pseudomonas putida* biofilmi, kui bakterit kasvatada LB-söötmes kuid mitte M9 glc CAA defineeritud söötmes. Selles töös uuriti söötmekomponentide mõju *P. putida* biofilmi moodustumisele *fis*-i üleekspressiooni tingimustes. Püstitati kaks hüpoteesi: M9-söötme komponent ei võimalda *fis*-i üleekspressioonist sõltuvat tugeva biofilmi tekkimist või alternatiivselt, Fis-i biofilmi võimendav efekt tekib mõne LB söötmekomponendi juuresolekul.

Tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

- M9-söötme komponendid ei pärsi *fis*-i üleekspressiooni soodustavat mõju *P. putida* biofilmile.
- LB sisaldab komponenti, mille olemasolul tekib nn *fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt. Selleks söötmekomponendiks on trüptoon, mille lisamisel M9 glc CAA söötmesse ilmnes Fis-i biofilmi võimendav efekt.
- *Fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt võib olla seotud valgulise komponendi sisaldusega söötmes.
- LapA on oluline Fis-i biofilmi võimendava efekti tekkimiseks trüptooniga M9-söötmes.

Effect of media components on *P. putida* biofilm

Marge Puhm

Summary

Pseudomonas species are important bacteria, this genus contains both pathogens and beneficial bacteria. The pathogenic species belonging to the *Pseudomonas* genus cause diseases in plants (*P. syringae*), insect (*P. entomophila*) and humans (*P. aeruginosa*). The beneficial species such as *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* and *P. putida* promote plant growth. *P. putida* is an able colonizer of plant roots, it forms biofilm on them and inhibits the growth of pathogenic bacteria. The biofilm development of *P. putida* is influenced by different signals from the rhizosphere.

In our laboratory, it has been previously shown that global regulator Fis (engl *k factor for inversion stimulation*) plays an important role in the formation of *P. putida*'s biofilm. Fis increases the expression of an important biofilm adhesin, LapA, thus binding the bacterium to the surface. Interestingly, the biofilm-enhancing effect of Fis overexpression is only present LB full media and not in the defined M9 medium. The aim of this work is to find out on which medium component does Fis's biofilm-enhancing effect depend on. Two hypotheses were proposed: some M9 medium component does not allow the formation of a strong Fis-enhanced biofilm or, alternatively, the Fis increasing effect on biofilm formation only occurs in the presence of some LB medium components. The results can be summarized as follows:

- The components of the M9 medium do not inhibit the Fis-enhanced biofilm.
- LB contains a component, tryptone, that allows Fis's positive effect on biofilm to emerge.
- As tryptone contains substantial amounts of peptides, then Fis overexpression's effect on biofilm may be related to the protein content of the medium.
- LapA is important for the Fis-enhanced biofilm in M9 medium supplemented with tryptone.

Kasutatud kirjandus

- Ainelo, Hanna, Andrio Lahesaare, Annika Teppo, Maia Kivisaar, ja Riho Teras. 2017. „The Promoter Region of LapA and Its Transcriptional Regulation by Fis in *Pseudomonas Putida*“. *PLOS ONE* 12 (9): e0185482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185482>.
- Ali Azam, Talukder, Akira Iwata, Akiko Nishimura, Susumu Ueda, ja Akira Ishihama. 1999. „Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid“. *Journal of Bacteriology* 181 (20): 6361–70.
- Amador, Cristina I., Inés Canosa, Fernando Govantes, ja Eduardo Santero. 2010. „Lack of CbrB in *Pseudomonas Putida* Affects Not Only Amino Acids Metabolism but Also Different Stress Responses and Biofilm Development“. *Environmental Microbiology* 12 (6): 1748–61. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02254.x>.
- Badri, Dayakar V, Tiffany L Weir, Daniel van der Lelie, ja Jorge M Vivanco. 2009. „Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions“. *Current Opinion in Biotechnology, Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology*, 20 (6): 642–50. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.014>.
- Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson, ja R. C. Johnson. 1992. „Dramatic Changes in Fis Levels upon Nutrient Upshift in *Escherichia Coli*“. *Journal of Bacteriology* 174 (24): 8043–56. <https://doi.org/10.1128/jb.174.24.8043-8056.1992>.
- Beach, Michael B., ja Robert Osuna. 1998. „Identification and Characterization of Thefis Operon in Enteric Bacteria“. *Journal of Bacteriology* 180 (22): 5932–46.
- Beauregard, Pascale B., Yunrong Chai, Hera Vlamakis, Richard Losick, ja Roberto Kolter. 2013. „*Bacillus Subtilis* Biofilm Induction by Plant Polysaccharides“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (17): E1621–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>.
- Bolwerk, Annouschka, Anastasia L. Lagopodi, André H. M. Wijnjes, Gerda E. M. Lamers, Thomas F. C. Chin-A-Woeng, Ben J. J. Lugtenberg, ja Guido V. Bloemberg. 2003. „Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Radicis-Lycopersici*“. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (11): 983–93. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.11.983>.
- Branda, Steven S., Åshild Vik, Lisa Friedman, ja Roberto Kolter. 2005. „Biofilms: the matrix revisited“. *Trends in Microbiology* 13 (1): 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>.
- Cárcamo-Oyarce, Gerardo, Putthapoom Lumjiaktase, Rolf Kümmerli, ja Leo Eberl. 2015. „Quorum Sensing Triggers the Stochastic Escape of Individual Cells from *Pseudomonas Putida* Biofilms“. *Nature Communications* 6 (jaanuar): 5945. <https://doi.org/10.1038/ncomms6945>.
- Chang, Woo-Suk, Martijn van de Mortel, Lindsey Nielsen, Gabriela Nino de Guzman, Xiaohong Li, ja Larry J. Halverson. 2007. „Alginate Production by *Pseudomonas Putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions“. *Journal of Bacteriology* 189 (22): 8290–99. <https://doi.org/10.1128/JB.00727-07>.
- Chin-A-Woeng, Thomas F. C., Daan van den Broek, Gert de Voer, Koen M. G. M. van der Drift, Sietske Tuinman, Jane E. Thomas-Oates, Ben J. J. Lugtenberg, ja Guido V. Bloemberg. 2001. „Phenazine-1-Carboxamide Production in the Biocontrol Strain *Pseudomonas Chlororaphis* PCL1391 Is Regulated by Multiple Factors Secreted into the Growth

- Medium“. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (8): 969–79. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.8.969>.
- Chin-A-Woeng, Thomas F. C., Wessel de Priester, Arjan J. van der Bij, ja Ben J. J. Lugtenberg. 1997. „Description of the Colonization of a Gnotobiotic Tomato Rhizosphere by *Pseudomonas Fluorescens* Biocontrol Strain WCS365, Using Scanning Electron Microscopy“. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10 (1): 79–86. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.79>.
- Corral-Lugo, Andrés, Jesús De la Torre, Miguel A. Matilla, Matilde Fernández, Bertrand Morel, Manuel Espinosa-Urgel, ja Tino Krell. 2016. „Assessment of the Contribution of Chemoreceptor-Based Signalling to Biofilm Formation: Chemoreceptor-Mediated Signalling in Biofilm Formation“. *Environmental Microbiology* 18 (10): 3355–72. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13170>.
- Danhorn, Thomas, ja Clay Fuqua. 2007. „Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria“. *Annual Review of Microbiology* 61 (1): 401–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>.
- Davey, Mary Ellen, ja George A. O’toole. 2000. „Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4): 847–67. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>.
- Davies, David. 2003. „Understanding Biofilm Resistance to Antibacterial Agents“. *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (2): 114–22. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>.
- Espeland, E. M., ja R. G. Wetzel. 2001. „Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota“. *Microbial Ecology* 42 (4): 572–85. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-1023-7>.
- Espinosa-Urgel, Manuel, Roberto Kolter, ja Juan-Luis Ramos. 2002. „Root Colonization by *Pseudomonas Putida*: Love at First Sight“. *Microbiology* 148 (2): 341–43. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-341>.
- Espinosa-Urgel, Manuel, Amparo Salido, ja Juan-Luis Ramos. 2000. „Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas Putida* to Seeds“. *Journal of Bacteriology* 182 (9): 2363–69. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2363-2369.2000>.
- Finkel, S.E., ja R.C. Johnson. 1992. „The Fis protein: it’s not just for DNA inversion anymore“. *Molecular Microbiology* 6 (22): 3257–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02193.x>.
- Flemming, Hans-Curt, ja Jost Wingender. 2010. „The Biofilm Matrix“. *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623–33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Flemming, Hans-Curt, Jost Wingender, Ulrich Szewzyk, Peter Steinberg, Scott A. Rice, ja Staffan Kjelleberg. 2016. „Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life“. *Nature Reviews Microbiology* 14 (9): 563–75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- Gjermansen Morten, Nilsson Martin, Yang Liang, ja Tolker-Nielsen Tim. 2010. „Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms“. *Molecular Microbiology* 75 (4): 815–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06793.x>.
- Gjermansen, Morten, Paula Ragas, Claus Sternberg, Søren Molin, ja Tim Tolker-Nielsen. 2005. „Characterization of Starvation-Induced Dispersion in *Pseudomonas Putida* Biofilms“. *Environmental Microbiology* 7 (6): 894–904. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00775.x>.

- Halan, Babu, Katja Buehler, ja Andreas Schmid. 2012. „Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses“. *Trends in Biotechnology* 30 (9): 453–65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.003>.
- Hall-Stoodley, Luanne, J. William Costerton, ja Paul Stoodley. 2004. „Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases“. *Nature Reviews Microbiology* 2 (2): 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, ja G. A. O'Toole. 2003. „Transition from Reversible to Irreversible Attachment during Biofilm Formation by *Pseudomonas Fluorescens* WCS365 Requires an ABC Transporter and a Large Secreted Protein.“ *Molecular Microbiology* 49 (4): 905–18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x>.
- Højby, Niels, Helle Krogh Johansen, Claus Moser, Zhijun Song, Oana Ciofu, ja Arsalan Kharazmi. 2001. „*Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth“. *Microbes and Infection* 3 (1): 23–35. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01349-6).
- Ishihama, Akira. 2009. „The Nucleoid: An Overview“. *EcoSal Plus* 3 (2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.2.6>.
- Jahn, A., T. Griebbe, ja P. H. Nielsen. 1999. „Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix“. *Biofouling* 14 (1): 49–57. <https://doi.org/10.1080/08927019909378396>.
- Jakovleva, Julia, Annika Teppo, Anna Velts, Signe Saumaa, Hanna Moor, Maia Kivisaar, ja Riho Teras. 2012. „Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation“. *Microbiology* 158 (3): 708–20. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053355-0>.
- Kamilova Faina, Lamers Gerda, ja Lugtenberg Ben. 2008. „Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores“. *Environmental Microbiology* 10 (9): 2455–61. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01638.x>.
- Klausen, Mikkel, Morten Gjermansen, Jan-Ulrich Kreft, ja Tim Tolker-Nielsen. 2006. „Dynamics of Development and Dispersal in Sessile Microbial Communities: Examples from *Pseudomonas Aeruginosa* and *Pseudomonas Putida* Model Biofilms“. *FEMS Microbiology Letters* 261 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x>.
- Kuiper, Irene, Lev V. Kravchenko, Guido V. Bloemberg, ja Ben J. J. Lugtenberg. 2002. „*Pseudomonas Putida* Strain PCL1444, Selected for Efficient Root Colonization and Naphthalene Degradation, Effectively Utilizes Root Exudate Components“. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (7): 734–41. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.734>.
- Kuzyakov, Yakov, ja Grzegorz Domanski. 2000. „Carbon Input by Plants into the Soil. Review“. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163 (4): 421–31. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R).
- Lahesaaire, Andrio, Hanna Ainelo, Annika Teppo, Maia Kivisaar, Hermann J. Heipieper, ja Riho Teras. 2016. „LapF and Its Regulation by Fis Affect the Cell Surface Hydrophobicity of *Pseudomonas Putida*“. *PLOS ONE* 11 (11): e0166078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166078>.
- Le Magrex-Debar, Elisabeth, Jérôme Lemoine, Marie-Paule Gellé, Louis-Frédéric Jacquelin, ja Claude Choisy. 2000. „Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging“. *International Journal of Food Microbiology* 55 (1): 239–43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00177-X).
- Little, Brenda J., ja Jason S. Lee. 2014. „Microbiologically influenced corrosion: an update“. *International Materials Reviews* 59 (7): 384–93. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000035>.

- Lugtenberg, Ben J. J., Thomas F. C. Chin-A-Woeng, ja Guido V. Bloemberg. 2002. „Microbe–plant Interactions: Principles and Mechanisms“. *Antonie van Leeuwenhoek* 81 (1–4): 373–83. <https://doi.org/10.1023/A:1020596903142>.
- Lugtenberg, Ben J. J., Linda Dekkers, ja Guido V. Bloemberg. 2001. „Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas*“. *Annual Review of Phytopathology* 39 (1): 461.
- Lugtenberg, Ben J. J., ja Linda C. Dekkers. 1999. „What Makes *Pseudomonas* Bacteria Rhizosphere Competent?“. *Environmental Microbiology* 1 (1): 9–13. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00005.x>.
- Lugtenberg, Ben, ja Faina Kamilova. 2009. „Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria“. *Annual Review of Microbiology* 63 (1): 541–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.
- Lv, Mingfa, Yufan Chen, Lisheng Liao, Zhibin Liang, Zurong Shi, Yingxin Tang, Sixuan Ye, Jianuan Zhou, ja Lianhui Zhang. 2018. „Fis Is a Global Regulator Critical for Modulation of Virulence Factor Production and Pathogenicity of *Dickeya Zeae*“. *Scientific Reports* 8 (1): 341. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18578-2>.
- Lynch, J. M., ja J. M. Whipps. 1990. „Substrate Flow in the Rhizosphere“. *Plant and Soil* 129 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00011685>.
- Mahajan-Miklos, Shalina, Man-Wah Tan, Laurence G. Rahme, ja Frederick M. Ausubel. 1999. „Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model“. *Cell* 96 (1): 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80958-7).
- Martínez-Gil, Marta, José Miguel Quesada, María Isabel Ramos-González, María Isabel Soriano, Ricardo E. de Cristóbal, ja Manuel Espinosa-Urgel. 2013. „Interplay between extracellular matrix components of *Pseudomonas putida* biofilms“. *Research in Microbiology* 164 (5): 382–89. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.021>.
- Martínez-Gil, Marta, María Isabel Ramos-González, ja Manuel Espinosa-Urgel. 2014. „Roles of Cyclic Di-GMP and the Gac System in Transcriptional Control of the Genes Coding for the *Pseudomonas putida* Adhesins LapA and LapF“. *Journal of Bacteriology* 196 (8): 1484–95. <https://doi.org/10.1128/JB.01287-13>.
- Martínez-Gil, Marta, Fátima Yousef-Coronado, ja Manuel Espinosa-Urgel. 2010. „LapF, the Second Largest *Pseudomonas putida* Protein, Contributes to Plant Root Colonization and Determines Biofilm Architecture“. *Molecular Microbiology* 77 (3): 549–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x>.
- Matilla, Miguel A., Manuel Espinosa-Urgel, José J. Rodríguez-Herva, Juan L. Ramos, ja María Isabel Ramos-González. 2007. „Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere“. *Genome Biology* 8 (september): R179. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r179>.
- McNeill, Karol, ja I. R. Hamilton. 2003. „Acid Tolerance Response of Biofilm Cells of *Streptococcus Mutans*“. *FEMS Microbiology Letters* 221 (1): 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00164-2).
- Miller, Jeffrey H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics: Laboratory Manual*. Labo. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Molina, Lázaro, Cayo Ramos, Estrella Duque, M. Carmen Ronchel, Juan M. García, Lene Wyke, ja Juan L. Ramos. 2000. „Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions“. *Soil Biology and Biochemistry* 32 (3): 315–21. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00156-X).

- Moor, Hanna, Annika Teppo, Andrio Lahesaare, Maia Kivisaar, ja Riho Teras. 2014. „Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF“. *Microbiology* 160 (12): 2681–93. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082503-0>.
- Morgan, J. a. W., G. D. Bending, ja P. J. White. 2005. „Biological Costs and Benefits to Plant–microbe Interactions in the Rhizosphere“. *Journal of Experimental Botany* 56 (417): 1729–39. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>.
- Mortel, M. van de, W.-S. Chang, ja L. J. Halverson. 2004. „Differential Tolerance of *Pseudomonas Putida* Biofilm and Planktonic Cells to Desiccation“. *Biofilms* 1 (4): 361–68. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001528>.
- Navarro, Marcos V. A. S., Peter D. Newell, Petya V. Krasteva, Debashree Chatterjee, Dean R. Madden, George A. O’Toole, ja Holger Sondermann. 2011. „Structural Basis for C-Di-GMP-Mediated Inside-Out Signaling Controlling Periplasmic Proteolysis“. *PLOS Biology* 9 (2): e1000588. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000588>.
- Nelson K. E., Weinell C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., Fouts D. E., et al. 2002. „Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440“. *Environmental Microbiology* 4 (12): 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>.
- Newell, Peter D., Chelsea D. Boyd, Holger Sondermann, ja George A. O’Toole. 2011. „A C-Di-GMP Effector System Controls Cell Adhesion by Inside-Out Signaling and Surface Protein Cleavage“. *PLOS Biology* 9 (2): e1000587. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000587>.
- Nielsen, Lindsey, Xiaohong Li, ja Larry J. Halverson. 2011. „Cell–cell and Cell–surface Interactions Mediated by Cellulose and a Novel Exopolysaccharide Contribute to *Pseudomonas Putida* Biofilm Formation and Fitness under Water-limiting Conditions“. *Environmental Microbiology* 13 (5): 1342–56. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02432.x>.
- Nilsson, Martin, Wen-Chi Chiang, Mustafa Fazli, Morten Gjermansen, Michael Givskov, ja Tim Tolker-Nielsen. 2011. „Influence of Putative Exopolysaccharide Genes on *Pseudomonas Putida* KT2440 Biofilm Stability“. *Environmental Microbiology* 13 (5): 1357–69. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02447.x>.
- O’Toole, G., H.b. Kaplan, ja R. Kolter. 2000. *Biofilm Formation as Microbial Development*. Kd 54. Annual Review of Microbiology. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>.
- Pan, Clark Q., Steven E. Finkel, Sarah E. Cramton, Jin-An Feng, David S. Sigman, ja Reid C. Johnson. 1996. „Variable Structures of Fis-DNA Complexes Determined by Flanking DNA – Protein Contacts“. *Journal of Molecular Biology* 264 (4): 675–95. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0669>.
- Petrova, Olga E, ja Karin Sauer. 2016. „Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion“. *Current Opinion in Microbiology*, Cell regulation, 30 (aprill): 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>.
- Ramos-González, María Isabel, María L. Travieso, María I. Soriano, Miguel A. Matilla, Óscar Huertas-Rosales, Laura Barrientos-Moreno, Víctor G. Tagua, ja Manuel Espinosa-Urgel. 2016. „Genetic Dissection of the Regulatory Network Associated with High C-Di-GMP Levels in *Pseudomonas Putida* KT2440“. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01093>.
- Rij, E. Tjeerd van, Geneviève Girard, Ben J. J. Lugtenberg, ja Guido V. Bloemberg. 2005. „Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391“. *Microbiology* 151 (8): 2805–14. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28063-0>.

- Rosche, Bettina, Xuan Zhong Li, Bernhard Hauer, Andreas Schmid, ja Katja Buehler. 2009. „Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis?“ *Trends in Biotechnology* 27 (11): 636–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.08.001>.
- Sauer, Karin, ja Anne K. Camper. 2001. „Characterization of Phenotypic Changes In *Pseudomonas Putida* in Response to Surface-Associated Growth“. *Journal of Bacteriology* 183 (22): 6579–89. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6579-6589.2001>.
- Sauer, Karin, Anne K. Camper, Garth D. Ehrlich, J. William Costerton, ja David G. Davies. 2002. „*Pseudomonas Aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm“. *Journal of Bacteriology* 184 (4): 1140–54. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>.
- Schumann, G. L., ja C. J. D’Arcy. 2006. „Essential Plant Pathology.“ *Essential Plant Pathology*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063185422>.
- Segura, Ana, ja Juan Luis Ramos. 2013. „Plant–bacteria interactions in the removal of pollutants“. *Current Opinion in Biotechnology*, Energy biotechnology • Environmental biotechnology, 24 (3): 467–73. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.011>.
- Silby, Mark W., Craig Winstanley, Scott A. C. Godfrey, Stuart B. Levy, ja Robert W. Jackson. 2011. „*Pseudomonas* Genomes: Diverse and Adaptable“. *FEMS Microbiology Reviews* 35 (4): 652–80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- Simons, M., A. J. van der Bij, I. Brand, L. A. de Weger, C. A. Wijffelman, ja B. J. Lugtenberg. 1996. „Gnotobiotic System for Studying Rhizosphere Colonization by Plant Growth-Promoting *Pseudomonas* Bacteria“. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 9 (7): 600–607.
- Simons, Marco, Hjalmar P. Permentier, Letty A. de Weger, Carel A. Wijffelman, ja Ben J. J. Lugtenberg. 1997. „Amino Acid Synthesis Is Necessary for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens* Strain WCS365“. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10 (1): 102–6. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.102>.
- Steinberger, R. E., ja P. A. Holden. 2005. „Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms“. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5404–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5404-5410.2005>.
- Zerbs, Sarah, Peter J. Korajczyk, Philippe H. Noiro, ja Frank R. Collart. 2017. „Transport Capabilities of Environmental *Pseudomonads* for Sulfur Compounds“. *Protein Science* 26 (4): 784–95. <https://doi.org/10.1002/pro.3124>.
- Zhang, Ruifu, Jorge M Vivanco, ja Qirong Shen. 2017. „The unseen rhizosphere root–soil–microbe interactions for crop production“. *Current Opinion in Microbiology*, Environmental microbiology * CRISPRcas9, 37 (juuni): 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.008>.
- Zuo, Rongjun. 2007. „Biofilms: Strategies for Metal Corrosion Inhibition Employing Microorganisms“. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (6): 1245–53. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1130-6>.
- Teitzel, Gail M., ja Matthew R. Parsek. 2003. „Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas Aeruginosa*“. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 2313–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>.
- Teras, Riho, Julia Jakovleva, ja Maia Kivisaar. 2009. „Fis negatively affects binding of Tn4652 transposase by out-competing IHF from the left end of Tn4652“. *Microbiology* 155 (4): 1203–14. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022830-0>.
- Turnbull, Gillian A., J. Alun W. Morgan, John M. Whipps, ja Jon R. Saunders. 2001. „The Role of Motility in the in Vitro Attachment of *Pseudomonas Putida* PaW8 to Wheat Roots“. *FEMS Microbiology Ecology* 35 (1): 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00788.x>.
- Velts, Anna. 2010. „Risofäärse bakteri *Pseudomonas putida* Fis-i ekspressioon“. *magistritöö*, TÜ.

- Vílchez, Susana, Lázaro Molina, Cayo Ramos, ja Juan L. Ramos. 2000. „Proline Catabolism by *Pseudomonas Putida*: Cloning, Characterization, and Expression of the Put Genes in the Presence of Root Exudates“. *Journal of Bacteriology* 182 (1): 91–99. <https://doi.org/10.1128/JB.182.1.91-99.2000>.
- Wang, Yanxu, ja Hiroshi Oyaizu. 2011. „Enhanced remediation of dioxins-spiked soil by a plant–microbe system using a dibenzofuran-degrading *Comamonas* sp. and *Trifolium repens* L.“ *Chemosphere* 85 (7): 1109–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.028>.
- Weert, Sandra de, Irene Kuiper, Ellen L. Lagendijk, Gerda E. M. Lamers, ja Ben J. J. Lugtenberg. 2004. „Role of Chemotaxis Toward Fusaric Acid in Colonization of Hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365“. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (11): 1185–91. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1185>.
- Weller, David M., Jos M. Raaijmakers, Brian B. McSpadden Gardener, ja Linda S. Thomashow. 2002. „Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens“. *Annual Review of Phytopathology* 40 (1): 309.
- Wingender, Jost, ja Hans-Curt Flemming. 2011. „Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens“. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, The second European PhD students workshop: Water and health ? Cannes 2010, 214 (6): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>.
- Winkelströter, Lizziane Kretli, Fernanda Barbosa dos Reis Teixeira, Eliane Pereira Silva, Virgínia Farias Alves, ja Elaine Cristina Pereira De Martinis. 2014. „Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology“. *Microbial Ecology* 68 (1): 35–46. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0347-4>.
- Yousef-Coronado, Fátima, María Isabel Soriano, Liang Yang, Søren Molin, ja Manuel Espinosa-Urgel. 2011. „Selection of hyperadherent mutants in *Pseudomonas putida* biofilms“. *Microbiology* 157 (8): 2257–65. <https://doi.org/10.1099/mic.0.047787-0>.
- Yuste Luis, Hervás Ana B., Canosa Inés, Tobes Raquel, Jiménez José Ignacio, Nogales Juan, Pérez-Pérez Manuel M., et al. 2005. „Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray“. *Environmental Microbiology* 8 (1): 165–77. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00890.x>.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marge Puhm (01.04.1973)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Söötme komponendid mõju Pseudomonas putida biofilmile“, mille juhendajad on Hanna Aineloo ja Riho Teras,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018